



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE EXTRAKTU Z
BEZOVÝCH KVĚTŮ**

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACT FROM ELDERBERRY FLOWERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Leona Lukšová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1305/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Leona Lukšová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Příprava a charakterizace extraktu z bezových květů

Zadání diplomové práce:

Literární část:

- 1) Stručná botanická charakteristika bezu černého *Sambucus nigra*, L.
- 2) Účinné látky obsažené v bezových květech
- 3) Struktura pokožky
- 4) Popis HPLC instrumentace

Experimentální část:

- 1) Optimalizace extrakce bezových květů
- 2) Ověření HPLC systému pro separace vybraných fenolických látek
- 3) Prostup extraktu z bezových květů přes simulant lidské kůže (s využitím Franzovy cely)
- 4) Zpracování dat a vyhodnocení experimentů

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Leona Lukšová
student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá definováním podmínek pro přípravu extraktu z květů černého bezu tak, aby si připravený extrakt zachoval co nejvíce biologicky aktivních látek pro další využití např. v lázeňství. Dále se práce zabývá prostupností vybraných fenolických kyselin, jmenovitě kyseliny chlorogenové, kávové a ferulové, pokožkou prostřednictvím Francových difúzních cel.

V teoretické části práce je uvedeno taxonomické zařazení, popis a využití černého bezu. Dále jsou zde zmíněny významné účinné látky, především fenolické kyseliny, které mají blahodárné účinky na pokožku. Detailně je popsána anatomie kůže a problematika prostupu fenolických kyselin pokožkou. A nakonec je uveden popis vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Experimentální část se věnuje ověření optimálních podmínek pro přípravu extraktu. Nejlepší variantou je extrakce květů vodou o teplotě 100 °C po dobu 10 minut v poměru 1 hmotnostní díl suchých květů a 10 objemových dílů vroucí vody. Jako způsob uchování extraktu bylo testováno jeho zakonzentrování na vakuové odparce. Byl také zkoumán poměr květů a stonků na obsah fenolických kyselin v extraktu.

U extraktu z květů a jeho zahuštěné verze byla propustnost pokožkou zkoumána pomocí transdermální absorpce. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jestli vůbec a jak mnoho procházejí výše uvedené fenolické kyseliny pokožkou. Jako kožní membrána byla využita vepřová kůže z ušního boltce.

Všechna stanovení výše uvedených fenolických kyselin ve všech vzorcích byla realizována kapalinovou chromatografií.

Klíčová slova

Extrakt z květu bezu černého, fenolické kyseliny, kožní membrána, transdermální absorpce, Franzova cela, kapalinová chromatografie.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the determination of conditions for the preparation of elderberry extract so that the prepared extract retains as many biologically active substances as possible and the way of preserving this extract. Furthermore, the work deals with the transmittance of already specific phenolic acids, namely chlorogenic acid, coffee and ferulic skin, through the Franc diffusion cells.

In the theoretical part of the thesis there is a taxonomic classification, description and use of elderberry. Furthermore, significant active substances, in particular phenolic acids, are mentioned. beneficial effects on the skin. The anatomy of the skin and the problem of the penetration of phenolic acids through the skin are described in detail. Finally, a description of high performance liquid chromatography is provided.

The experimental part is devoted to verification of optimal conditions for preparation of extract. The best option is to extract the flowers with water at 100 ° C for 10 minutes in a ratio of 1 part by weight of dry flowers and 10 parts by volume boiling water. The ratio of flowers and stems to the phenolic acid content of the extract was also investigated.

In the flower extract and its thickened version, the skin permeability was examined by transdermal absorption. The aim of this experiment was to find out if and how much the above mentioned phenolic acids go through the skin. As skin membrane, pork skin from the auricle was used.

All determinations of the above phenolic acids in all samples were carried out by liquid chromatography.

KEYWORDS

Elderflower extract, phenolic acid, skin membrane, transdermal absorption, Franz cell, liquid chromatography.

LUKŠOVÁ, Leona. *Příprava a charakterizace extraktu z bezových květů* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113267>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Milena Vespalcová.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, pomoc, cenné rady, vstřícnost a odborné vedení v průběhu psaní mé diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	Teoretická část	10
2.1	Bez černý.....	10
2.1.1	Popis rostliny	10
2.1.2	Taxonomie	11
2.1.3	Rozšíření	12
2.1.4	Významné odrůdy.....	13
2.1.5	Význam a využití	13
2.2	Účinné látky obsažené v bezových květech.....	14
2.2.1	Primární a sekundární metabolity	14
2.2.2	Účinné látky v černém bezu.....	14
2.2.3	Vitaminy	15
2.2.4	Silice	17
2.2.5	Třísloviny.....	18
2.2.6	Sacharidy.....	18
2.2.7	Organické kyseliny	18
2.2.8	Glykosidy.....	18
2.2.9	Fenolické látky.....	19
2.3	Struktura pokožky	26
2.3.1	Struktura pokožky.....	26
2.3.2	Transdermální absorpce	30
2.3.3	Prostup fenolických látek kůží.....	31
2.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	32
2.4.1	Historie HPLC	32
2.4.2	Princip HPLC.....	32
2.4.3	Instrumentace HPLC.....	34

3	Experimentální část.....	40
3.1	Laboratorní vybavení	40
3.1.1	Přístroje.....	40
3.1.2	Chemikálie	41
3.1.3	Pomůcky a další příslušenství.....	41
3.2	Analyzované vzorky.....	41
3.3	Ověření optimálních podmínek pro přípravu extraktu z černého bezu	42
3.3.1	Ověření navážky sušených květů.....	42
3.3.2	Ověření extrakční teploty vody.....	42
3.3.3	Příprava extraktu z různých částí květenství	42
3.3.4	Příprava zahuštěného extraktu	42
3.4	Stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky.....	42
3.5	Příprava roztoků standardů.....	43
3.6	Difuzní cely	44
3.6.1	Příprava zásobního roztoku chloridu sodného	44
3.6.2	Příprava kožních membrán	44
3.6.3	Sestavení měřicí aparatury (Franzovy cely)	45
3.6.4	Dávkování a odběr vzorků z/do difuzní cely	45
3.7	Analýza HPLC	47
3.8	Zpracování naměřených dat	47
4	Výsledky a diskuze	48
4.1	Ověření optimálních podmínek pro přípravu extraktu z černého bezu	48
4.1.1	Sestrojení kalibrační řady pro stanovení celkových polyfenolů	48
4.1.2	Ověření navážky sušených květů.....	49
4.1.3	Ověření teploty vody.....	51
4.1.4	Extrakt z různých částí rostliny.....	52
4.2	Analýza HPLC	54
4.2.1	Úprava separačního systému.....	54
4.2.2	Výpočet na nejbližší kalibrační standard	55

4.2.3	Analýza připravených extraktů	56
4.3	Difuzní cely	59
4.3.1	Příprava kožní membrány	59
4.3.2	Závislost množství absorbované látky na čase působení	60
5	Závěr	66
6	seznam použité literatury	68
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	73
8	Seznam obrázků	74
9	Seznam tabulek	76
10	seznam Příloh	77

1 ÚVOD

Černý bez byl člověku znám již od dob prehistorických. Byl popisován jako kouzelný či posvátný strom. Jelikož se černému bezu daří prakticky všude, netrpí téměř žádnými chorobami a obsahuje řadu léčivých látek, vzrostl zájem o jeho využití nejen pro potravinářské účely, ale i v přírodní kosmetice. Zvýšený zájem o tuto rostlinu byl podnětem pro šlechtění nových a plodnějších odrůd, jejichž kvalita je umocněna, pokud se pěstují v biosadech.

První biosad šlechtěných bezů v ČR se nachází v Hustopečích a majitel tohoto sadu zadal FCH požadavek na přípravu extraktu, z květů druhého a třetího sběru pro využití v lázeňství. První částí požadavku bylo zjištění podmínek pro přípravu extraktu, při kterých si zanechá co nejvíce biologicky aktivních látek. Druhou částí požadavku bylo najít přijatelný způsob, jak daný extrakt uchovat pro následné využití. Lyofilizace extraktu byla kvůli vysokým pořizovacím nákladům zamítnuta.

Stanovení podmínek extrakce bezových květů již bylo vypracováno v předcházející práci. Proto se tato diplomová práce věnuje jejich ověření a rozšíření. Jako postup zakoncentrování připraveného extraktu bylo využito místo lyofilizace vakuové odparky.

K charakterizaci připraveného a zahuštěného extraktu byly vybrány fenolické kyseliny, které si rostlina vyrábí na svoji ochranu před vnějším nebezpečím, jako je UV záření nebo hmyz. Tyto kyseliny se řadí mezi přírodní antioxidanty. Dále disponují také protizánětlivými, antialergickými a dalšími účinky pozitivně působící na pokožku. Proto byly právě tyto látky vybrány jako ty nejdůležitější z hlediska požadavku na lázeňské koupele. V připravených a zakoncentrovaných extraktech byly kapalinovou chromatografií stanovovány kyselina chlorogenová, kávová a ferulová.

V této diplomové práci byla také testována prostupnost uvedených tří kyselin přes pokožku. Prostupnost byla sledována metodou transdermální absorpce. Nejlepší variantou pro testování in vitro je lidská kůže, avšak velmi dobrou alternativou je kůže prasečí, odebraná z ušního boltce. Prasečí kůže je lidské blízká svou anatomií, fyziologií a chemickým složením. Proto byla také v této práci využita.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bez černý

Černý bez byl člověku znám již v dobách prehistorických, jak dosvědčují nálezy bezových semen z doby kamenné a bronzové. Zápisy o černém bezu nacházíme v poměrně zachovalých starověkých řeckých, římských a středoasijských spisech lékařů, jimiž byli Galenos, Hippokrates, Avicenna a později i Paracelsus. Díky svým léčivým účinkům byl popisován jako posvátný či kouzelný strom [1].

2.1.1 Popis rostliny

Bez černý patří do čeledi zimolezovitých (*Caprifoliaceae*), k nimž náleží ještě mnoho dalších rodových skupin. Nejrozšířenější a z lékařského hlediska nejvíce ceněný je černý bez (*Sambucus nigra* L.).

Bez černý se může vyskytovat jako keř dosahující výšky až 5 metrů nebo jako strom, který dorůstá výšky až 10 metrů. Má šedohnědou až šedou rozpukanou kůru, letorosty jsou dužnaté a sytě zelené. Temně zelené listy jsou vstřícné, lichozpeřené, řapíkaté a bývají dlouhé 10-30 cm. Mají vejčitý, eliptický tvar. Po okrajích jsou pilovité, na vršku zašpičatělé a na rubu chlupaté [2].



Obrázek 1 Květ bezu černého [3]

Květy jsou bílé až krémové barvy, široké, charakteristicky aromatické a jsou uspořádány v plochých chocholičnatých květenstvích širokých 10–15 cm. Plody jsou kulaté trojsemenné

peckovičky, mající v průměru asi 6 mm. Zralé jsou černořialové až černé s purpurově červenou šťavnatou dužinou. Bez kvete od konce května do počátku července a od srpna do podzimu dochází k přeměně květů na lesklé černé až černořialové plody [2]. Černé peckovice jsou jedlé, ale zelené části rostliny a kůra jsou jedovaté. Lidové názvy jsou například bezinky, kozičky a smradinky [3].



Obrázek 2 Plody černého bezu [3]

2.1.2 Taxonomie

Bez černý patří do oddělení krytosemenných rostlin. Název oddělení je odvozen od vajíček, která jsou ukryta v pestících, tudíž se semena nachází v plodu vzniklém ze stěny semeníku. Krytosemenné rostliny se dělí na primitivní krytosemenné rostliny (*Magnoliopsida*), jednoděložné rostliny (*Liliopsida*) a pravé (vyšší) dvouděložné rostliny (*Rosopsida*), což jsou rostliny s menším a ustáleným počtem květních částí [4]. Bez černý patří do vyšších dvouděložných rostlin.

Dále patří do čeledi zimolezovitých, k nimž náleží ještě mnoho dalších rodových skupin, mimo jiné bez červený a kanadský bez. Pokud se však mluví o bezu, skoro vždy se myslí bez černý, který je nejrozšířenější [5].

Tabulka 1 Taxonomická tabulka bezu černého [5]

Klasifikační úroveň	Český název	Latinský název
Doména	Eukaryota	<i>Eukaryota</i>
Říše	Rostliny	<i>Plantae</i>
Kmen	Semenné	<i>Spermatophyta</i>
Podkmen	Krytosemenné	<i>Angiospermae</i>
Třída	Vyšší dvouděložné	<i>Dicotyledonae</i>
Řád	Šetkotvaré	<i>Dipsacales</i>
Čeleď	Zimolezovité	<i>Caprifoliaceae</i>
Rod	Bez	<i>Sambucus</i>
Druh	Bez černý	<i>Sambucus nigra</i>

2.1.3 Rozšíření

Bez černý se vyskytuje prakticky všude, od nížin až po vrchoviny. Je to evropský druh, nevyskytuje se jen v nejsevernější Evropě. V České republice se vyskytuje vyjma nejvyšších poloh skoro všude, nejvíce na rumištích, pustých místech, podél cest, u vodních toků, okolo skládek, v zahradách a parcích. Nejlépe se mu daří na dusíkatých a nejméně na vápenitých půdách. K půdní reakci je lhostejný, roste jak na půdách kyselých, tak i zásaditých. I když raší brzy, není náchylný k pozdním mrazům. Je to polostinná dřevina, v podrostu dobře zastiňuje půdu a opadem zlepšuje vlastnosti půdy.

Rozšiřuje se především díky ptákům, kteří se živí bezinkami a také díky intenzivní výmladkové činnosti zejména v oblasti kořenového krčku a na kmeni (z kořenů výmladky netvoří), v zanedbaných parcích utlačuje ostatní dřeviny. Při jeho likvidaci ho proto nestačí seříznout, musí se vykopat i s kořenovým krčkem. Uměle se vysazuje pouze na místech, kde ostatní keře selžou. Snese nekvalitní půdy, sucho, přímé slunce i stín. Velmi často je obtížným plevelem.

Bez černý chorobami netrpí, bývá napadán jen mšicemi a můžeme na něm najít houbu využívanou v gastronomii zvanou Jidášovo ucho [2, 6].

2.1.4 Významné odrůdy

- Haschberg

Tato odrůda se vyznačuje velmi nízkou náchylností k různým onemocněním a k napadení škůdci. Je odolná i proti silným deštům, které ji nijak nemohou poškodit.

- Donau

Odrůda má jen několik velkých květů, listy jsou rovněž velké, hladké a sytě zelené. Za zmínku u této odrůdy stojí vysoký podíl dřeně větví.

- Hamburg

Tato kultura je známá také pod názvem „černý diamant“ a tomuto jménu dělá skutečně čest, neboť se může pochlubit skutečně velkými šťavnatými plody. Odrůda je nejčastěji kultivována v severním Německu, v Rakousku a západní Evropě.

- Sambo

Kultura pochází z roku 1977 a je známá především pro výjimečně chutný sirup, připravovaný z plodů této odrůdy.

- Riese von Voöloch

Tato odrůda bezu, která je nenáročná na svoje pěstování, vyniká také velkými šťavnatými bobulemi. Jeden trs plodů této odrůdy váží mnohdy až 200 g, a proto se nelze divit, že právě tyto odrůdy jsou k pěstování nejvíce doporučovány. Další výhodou této odrůdy je pravidelné dozrávání plodů. Z praxe zkušených pěstitelů této odrůdy je známo, že odrůda dává dvojnásobné množství plodů než ostatní, běžně rostoucí odrůdy bezu [2].

2.1.5 Význam a využití

Sbírají se květenství poskytující oficiální drogu *Flos sambuci*. V době květu se odstřihují nůžkami a volně ukládají do košů, aby se nezapařila. Obvykle se suší celá květenství zavěšená na šňůrkách při teplotě do 45°C. Správně usušená droga je nažloutlé barvy, květní stopky mají žlutou až žlutohnědou barvu. Při dalším zpracování drogy by se neměly využívat příliš silné stopky a nahnědlé květy.

Černý bez je velmi využíván v lidovém léčitelství. Kromě listů jsou využívány také květy, plody, kůra, ale i kořeny. V léčitelství jsou nejvíce využívány květy, jako součást léčivých čajů při nachlazení, dále pro svůj močopudný a projímavý účinek. Slabě uklidňující a antineuralgické účinky jsou využity v některých druzích léků. Destilát připravený z květů má povzbuzující a jemně adstringentní účinky a je také využíván jako nosič pro pleťovou a oční kosmetiku. Mast z těchto květů se používá na léčbu opařenin, popálenin, omrzlin a jiných poranění, při kterých vznikají jizvy.

Plodenství známé jako bezinky a obsahující drogu *Flos sambuci* slouží především pro potravinářské účely. Vyrábí se z nich bezové víno a slouží jakou součást džemů, marmelád, sirupů apod. Kromě potravinářství se šťáva z plodů používá také v lidovém léčitelství při léčení migrén a nervových chorob. Z květů se také připravuje víno, ale především sirup, který se v posledních letech dostal do velké obliby mezi spotřebiteli [2, 3, 7].

Kromě léčitelství, kosmetiky a potravinářství se mladé rostlinky bezu černého vsazují do půdy, kterou následně chrání před erozí. Dřevo se využívá na menší výrobky a na Slovensku hlavně na výrobu píšťal a fujar [3, 7].

2.2 Účinné látky obsažené v bezových květech

2.2.1 Primární a sekundární metabolity

Základním syntetickým procesem v rostlinách je fotosyntetická asimilace – fotosyntéza, při které zelené rostliny využívají sluneční energii na tvorbu organických látek z oxidu uhličitého a z vody. Výsledným produktem fotosyntézy jsou sacharidy, ze kterých dalšími procesy v primárním metabolismu vznikají jednoduché nízkomolekulové látky (karboxylové kyseliny, aminokyseliny).

Primární metabolismus je pro organismus nezbytný a látky, které produkuje se označují jako primární metabolity a tvoří výchozí materiál pro specifické, geneticky zakódované a enzymy katalyzované reakce, při kterých vzniká spousta dalších sloučenin označovaných jako sekundární metabolity [8].

Zatímco produkty primárního metabolismu slouží jako stavební látka, produkty sekundárního metabolismu mohou intenzivně ovlivňovat naše tělesné funkce [9]. Produkuje látky, které například pomohou v boji proti konkurenci a interakci s jejich nepřáteli v době fylogenetického vývoje. Některé ze sekundárních látek jsou pro rostlinu nezbytné jako například fytohormony, které řídí životní děje organismu, purinové a pyrimidinové báze nukleových kyselin, porfyriny a koenzymy, které jsou součástí některých složitých enzymů a lignin, důležitá součást buněčné stěny atd. Podílejí se na zachování biologického druhu nebo slouží jako ochranné látky. Mezi sekundární metabolity jsou zahrnuty alkaloidy, látky terpenické, polyamidy a fenolické látky [8, 10].

2.2.2 Účinné látky v černém bezu

Pletiva rostlinného organismu se skládají z vody a sušiny. Obsah vody v pletivech rostoucích vegetativních orgánů rostlin je 70-95 %, v zásobních pletivech semen a v buňkách mechanických pletiv 5-15 %. Sušinu tvoří organické a minerální (anorganické) látky. Organické látky tvoří 90-95 % sušiny [9].

V květech bezu černého se nachází silice (0,03-0,14 %), glykosid rutin (až 3 %), cholin, organické kyseliny, kyanogenní glykosid sambunigrin, slizy, vitamin C (ve 100 g květů je až

350 mg), třísloviny, minerální látky (hlavně draslík), fenolické kyseliny (kyselina ferulová, kávová, chlorogenová) atd.

Plody jsou bohaté na přítomnost vitaminů skupiny B (B1, B2, B3, B6, B9), vitaminu C a E, vitaminu A, silice (0,01 %), organických kyselin (jablečná, vinná), tříslovin (asi 3 %), karotenoidů, alkaloidu sambucinu, anthokyanů (okolo 0,2-1 %), pektinů, škrobu, flavonoidů, sacharidů (7,5 %), minerálních látek (Ca, Fe, K, P, Mg) aj.

Listy obsahují flavonoidy, taniny, triterpenoidy, steroly, alkaloid sambucin, projímavě působící pryskyřici a dále karotenoidy.

V bezové kůře a kořeni se také vyskytují třísloviny, alkaloid sambucin, triterpenoidy, dále kyselina valerová, pryskyřice a žlutý éterický olej [11, 12, 13].

2.2.3 Vitaminy

Vitaminy jsou syntetizované autotrofními organismy, jedná se o organické nízkomolekulární sloučeniny. Heterotrofní organismy je vytváří velmi omezeně. Jsou získávány jako exogenní látky hlavně v potravě, některé z nich prostřednictvím střevní mikroflóry. Vitaminy hrají důležitou roli v látkové přeměně a regulaci metabolismu člověka. Mají funkci i jako součást katalyzátorů biochemických reakcí. Aby byly zabezpečeny normální fyziologické funkce člověka, je nutná přítomnost určitého množství vitaminů, které závisí od mnoha faktorů.

Při technologickém zpracování potravin dochází u velké většiny vitaminů ke ztrátě. Proto se vitaminy považují za indikátory používání správných a šetrných technologických postupů.

Obsah vitaminů se liší podle jednotlivých odrůd. Plody jsou bohaté na přítomnost vitaminů skupiny B (B1, B2, B3, B6, B9), vitaminu C a E, vitaminu A [13, 14].

2.2.3.1 Vitamin A

Vitamin A, nebo také retinol je antioxidant, který podporuje imunitní systém, udržuje buňky mladé a zdravé. Je nutný pro tvorbu protilátek a bílých krvinek, epitelových buněk, oční sítnice, rohovky a tvorbu zrakového purpuru-rodopsinu. Karoteny zabraňují korozi nechráněných částí buněk. Karoteny považujeme za provitaminy vitaminu A. Nejznámější je β -karoten.

2.2.3.2 Vitamin E

Vitamin E, neboli tokoferol má asi osm různých forem. Skládají se z vodíku, kyslíku a uhlíku. Obsahuje-li naše strava příliš málo vitaminu E, tuk v našem těle zežlukne, což má za následek například stařecké skvrny. Vitamin E zabraňuje tvorbě křečových žil, srdečním a mozkovým mrtvicím. Velice dobře hojí pooperační rány. Zabraňuje vzniku rakoviny, u žen má velký význam při léčbě neplodnosti. Je rozpustný v tucích.

2.2.3.3 Vitamin C

Vitamin C, nebo také kyselina askorbová, je antioxidant. Vedle vitaminu B₁ je vitamin C v přírodě nejvíce rozšířen. V rostlinné říši má uplatnění při fotosyntéze, jelikož reguluje množství aktivních forem kyslíku a dále při diferenciaci a růstu buněk. Kyselina askorbová se u živočichů podílí na biosyntéze prostaglandinů, mukopolysacharidů, cholesterolu, dále stimuluje transport sodných, chloridových a pravděpodobně vápenatých iontů. Pomáhá při absorpci a transportu iontových forem železa.

Vitamin C jako důležitý antioxidant reaguje s aktivními formami kyslíku (volnými radikály), dále s oxidovatelnými formami vitaminu E zajišťující ochranu vitaminu E a membránových lipidů před oxidací. Vitamin C také inhibuje tvorbu nitrosaminů, a působí tak jako modulátor mutageneze a karcinogeneze

V těle plní tedy ochranou funkci a pomáhá předcházet alergiím. Je rozpustný ve vodě a nedá se jím předávkovat, jelikož se vyplavuje močí [14, 15, 16].

2.2.3.4 Vitaminy skupiny B

Rozšíření vitaminu B je v přírodě velmi hojné. Téměř všechny rostliny si jej mohou vytvářet nebo si jej berou cizopasně z rostliny jiné [15].

Vitamin B₁

Vitamin B₁, neboli thiamin, je v těle živočichů esterifikován na thiamindifosfát. V této podobě je pak kofaktorem významných enzymů. Hlavní funkcí tiaminu je přeměna sacharidů, tuků a alkoholu v energii. Pomáhá také bránit tvorbě vedlejších toxických produktů tělesného metabolismu, které by jinak měly škodlivé účinky na srdce a nervový systém. Při nedostatku vitaminu B₁ nás postihne nechutenství, svalová únava, hubnutí a podrážděnost. Příčina spočívá v částečné oxidaci glukózy na kyselinu pyrohroznovou.

Vitamin B₂

Vitamin B₂, riboflavin, může být v podobě volné látky nebo jako kofaktor enzymů ve formě riboflavin-5'-fosfátu (flavinmononukleotidu, FMN) a flavinadenindinukleotidu (FAD), nazývaných jako flavoproteiny. Při nedostatku vitaminu B₂ je vzácná a projevuje se záněty kůže.

Vitamin B₃

Vitamin B₃ je jednotným pojmenováním pro kyselinu nikotinovou a její amid, kdy obě sloučeniny mají stejnou biologickou účinnost. Nikotinamid patří k nikotinamidadenindinukleotidu NAD a jeho fosforečnému esteru nikotinamidadenindinukleotid-fosfátu NADP, což jsou kofaktory několika set odlišných enzymů. V respiračních systémech se oba kofaktory účastní přenosu elektronů. NAD se

obvykle účastní na katabolismu bílkovin, cukrů, tuků a ethanolu. NADP nachází uplatnění při syntéze cholesterolu, makromolekul a mastných kyselin. Při nedostatku vitamínu B₃ se u nás projevují nejčastěji poškozením kůže, chybná funkce trávicího traktu a později demence.

Vitamin B₆

Vitamin B₆, neboli pyridoxin je dominantní formou vitamínu pyridoxal-5'-fosfát a pyridoxamin-5'-fosfát, kdežto v rostlinných pletivech se nachází hlavně pyridoxol-5'-fosfát. Při nedostatku vitamínu se u nás může objevit dermatitida a možné nervové poruchy.

Vitamin B₉

Vitamin B₉, neboli folacin je název pro biologicky aktivní deriváty kyseliny listové. Vitamin je kofaktorem enzymů v metabolismu aminokyselin, nukleotidů purinových a pyrimidinových [2,16].

2.2.4 Silice

Silice (aromatické oleje, éterické oleje či esenciální oleje) jsou směsi organických sloučenin s těkavým aroma, získané z rostlin. Tato směs je velmi bohatá na oleje a má pronikavou vůni.

Jejich konzistence je tedy olejovitá. Mají lipofilní povahu, ve vodě se špatně rozpouští. Zpravidla jsou bezbarvé, hlavně v čerstvém stavu. Při delší době úchovy snadno pryskyřičnatí, oxidují a tmavnou. Bývají zpravidla tekuté. Přítomnost nenasycených látek s dvojnými a trojnými vazbami způsobuje, že silice vykazují optickou aktivitu a vysoký index lomu.

Názvy těchto olejů jsou odvozeny od éterů, které těmto olejům přisuzují jejich výraznou vůni. Aroma bezového sirupu nebo šťávy obsahuje asi 34 různých chemických sloučenin. Hlavní součástí černého bezu je fenylacetaldehyd [2,17].

2.2.4.1 Minerální látky

U minerálních látek závisí na odrůdě Černého bezu a na části rostliny. V květech je nejvíce obsažen draslík. V plodech se kromě draslíku nejvíce nachází vápník, železo, fosfor a hořčík.

Tabulka 2 Množství minerálních látek v černém bezu podle odrůdy [18]

	Na	K	Ca	Mg	Cr	Co	Mn	Cu	Zn	Fe	Ni	V
Odrůda	[mg/l]	[g/l]	[μg/l]	[μg/l]	[μg/l]	[μg/l]	[mg/l]	[μg/l]	[mg/l]	[μg/l]	[μg/l]	[μg/l]
Riese von Vobloch	2,93	2,1	160	211	304	3,8	1,19	159	1,88	199	89	43
Hachsberg	4,7	2,5	268	129	147	5,9	3,2	224	1,01	423	99	3,6
Sambo	4,05	2,8	297	260	290	9,2	4,3	703	2,05	242	250	6,4

Draslík se spolu se sodíkem podílí na udržování rovnováhy tekutin a elektrolytů v buňkách a tkáních, reguluje krevní tlak a udržuje zdravý srdeční rytmus. Je nezbytný pro šíření nervových vzruchů. Krevní hladinu draslíku přesně řídí hormony. Nadměrný příjem má močopudné účinky a nedostatek draslíku způsobuje apatii, slabost, pomatenost a nadměrnou žízeň [2].

2.2.5 Třísloviny

Třísloviny jsou polyfenoly vysoké molární hmotnosti, rozpustné ve vodě. Vyznačují se stahujícími se, jemně dráždivými a antimikrobiálními účinky. Ve větším množství se vyskytují v listech, plodech, kůře nebo kmenu. Vyskytují se v nezralých plodech, jimž dávají trpkou chuť. Zráním jejich množství ubývá.

Bezový sirup obsahuje až 4 mg tříslovin oproti jiným ovocným sirupům, které obsahují jen 1 mg tříslovin. V lidovém léčitelství se využívají především na onemocnění gastrointestinálního traktu nebo na kožní poranění [2, 9].

2.2.6 Sacharidy

Tvoří významnou složku rostlinných organismů. Jsou významné jako zdroj energie pro metabolické procesy, zúčastňují se osmotických procesů a poskytují uhlík pro jiné organické látky [9].

Tvoří asi 10 % hmotnosti plodů. Celkový obsah se pohybuje kolem 104.2 g na kilogram černého bezu. Nejvíce jsou zastoupeny fruktosa (cca 44 g·kg⁻¹) a glukosa (cca 43 g·kg⁻¹), dále sacharóza (1 g·kg⁻¹) [19].

2.2.7 Organické kyseliny

Organické kyseliny se v rostlinných pletivech vyskytují hojně, účastní se metabolismu buňky, a mohou být volné nebo vázané ve významných rostlinných látkách, Vysoký podíl je především ve zrajících plodech [9].

V černém bezu je organických kyselin přibližně 5,1 g·kg⁻¹ plodů. Nejvíce je zastoupena kyselina citrónová (cca 3,5 g·kg⁻¹) a kyselina jablečná (cca 1,1 g·kg⁻¹), v menším množství kyselina šikimová (cca 0,3 g·kg⁻¹) a fumarová (cca 0,2 g·kg⁻¹) [19].

2.2.8 Glykosidy

Glykosidy jsou esterové deriváty cukrů. Vznikají reakcí cukru s fenolem, aminem či alkoholem a mají v rostlině ochrannou funkci, některé mají bakteriocidní a mykocidní účinky, jiné jsou barvivé [2, 9].

V černém bezu je nejvíce obsažen sambunigrin, který je obsažen především v syrových a nezralých bobulích. Je to kyanogenní glykosid, což znamená, že za určitých podmínek vytvoří kyselinu kyanovodíkovou. V bezové šťávě je však množství sambunigrinu velmi malé a naprosto neškodné pro lidské zdraví [9].

2.2.9 Fenolické látky

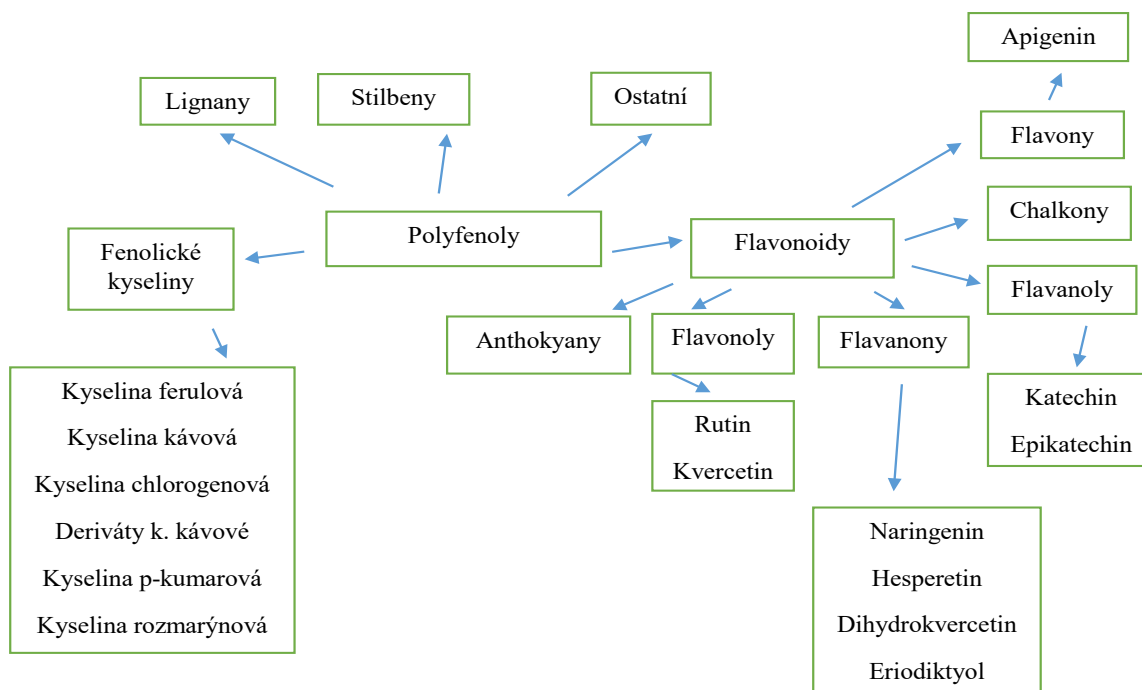
Jako fenolické látky se v organické chemii označuje třída sloučenin, které obsahují hydroxylovou funkční skupinu vázanou přímo na benzenový kruh. Nejjednodušším členem této skupiny je fenol a nejpočetnější skupinou jsou polyfenoly [4]. Polyfenolické sloučeniny jsou charakterizovány dvěma a více hydroxylovými skupinami, které jsou navázány na aromatickém jádře, zahrnují podskupiny jako fenolové kyseliny, flavonoidy, přírodní barviva, lignany a další, všechny jsou produkovány různými částmi rostlin [20].

Fenolické látky jsou součástí mnoha potravin. Uplatňují se jako vonné látky, chuťové látky nebo přírodní barviva [4]. Některé fenolické látky se řadí díky své vysoké biologické aktivitě mezi přírodní antioxidanty. Mají protizánětlivé, antivirotické, antialergické a antikarcinogenní účinky. V současnosti roste zájem a studium těchto přírodních látek, protože jejich příjem v potravě je dáván do souvislosti se snížením výskytu závažných nemocí jako je rakovina a kardiovaskulární choroby. Záměrně se proto přidávají do potravin, kde svým antioxidačním působením prodlužují jejich stálost [21].

Předpokládá se, že na protektivním účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Polyfenoly chrání lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považovaná za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerozy. Mohou také působit proti vzniku krevních sraženin a tímto způsobem snižovat riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice [22].

Také jsou to sekundární metabolity rostlin, které slouží jako ochrana před UV zářením, patogeny a oxidačním stresem. Antioxidační aktivita fenolických sloučenin závisí na struktuře, zejména počtu a polohách hydroxylových skupin a povaze substitucí na aromatických kruzích [4, 23].

Bylo zjištěno, že v čajích z bezových květů se vyskytují vyšší hodnoty fenolických látek než v čajích z bezových bobulí [21]. V bezových květech je obsaženo několik polyfenolických látek, například kyselina chlorogenová, kávová, ferulová, gallová, p-kumarová; kvercetin, kamferol, myricetin a rutin [21, 23].



Obrázek 3 Rozdělení polyfenolů [24]

2.2.9.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny jsou rozděleny do dvou hlavních skupin:

- Hydroxybenzoové kyseliny
- Hydroxyskořicové kyseliny

Jsou tedy odvozeny od kyseliny benzoové a kyseliny skořicové [25]. Deriváty kyseliny hydroxybenzoové se vyznačují svou typickou strukturou ve formě C6 – C1. Mezi tyto kyseliny se řadí kyselina gallová nebo p-hydroxybenzoová, Deriváty kyseliny hydroxyskořicové jsou aromatické sloučeniny s tří uhlíkatým bočním řetězcem. Jejich struktura je tedy ve tvaru C6 – C3. Do této skupiny se řadí kyselina kávová, ferulová, p-kumarová a sinapová. Tyto kyseliny jsou nejčastěji vázané esterovou vazbou na strukturní části buněčné stěny, jako jsou celulóza, hemicelulózy, lignin a proteiny [23, 25, 26]. Vázané fenolické sloučeniny mají větší antioxidační kapacitu, jelikož prochází horním gastrointestinálním traktem spolu s materiály buněčné stěny a jsou absorbovány krevní plazmou v průběhu trávení střevní mikroflórou [25].

Tyto sekundární metabolity jsou rostlinou vyráběny na ochranu před UV zářením, hmyzem, viry a bakteriemi. Některé druhy rostlin vyvíjejí fenolické kyseliny k potlačení růstu jiných rostlin, jedná se například o kyselinu kávovou a ferulovou.

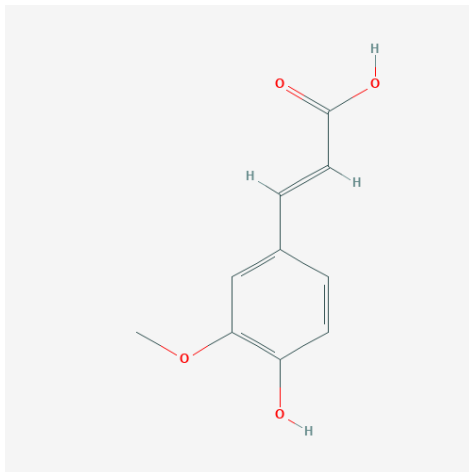
Fenolické kyseliny se syntetizují ze šikimátové dráhy L-fenylalaninu nebo L-tyrosinu [25].

Kyselina ferulová

Kyselina ferulová se nejvíce vyskytuje v semenech a listech rostlin. Nachází se jak ve své volné formě, tak kovalentně konjugovaná s polysacharidy rostlinných buněčných stěn, glykoproteiny, polyaminy, ligninem a hydroxymastnými kyselinami. Její tvorba probíhá šikimátovou dráhou, která začíná aminokyselinami, L-fenylalaninem a L-tyrosinem.

Je to antioxidant s velice silnou biologickou aktivitou. Kromě toho, že má antialergické, protikarcinogenní, protizánětlivé, antimikrobiální a antivirální účinky se využívá i v mnoha jiných odvětvích například při konzervaci potravin jako zesilovací činidlo, fotoprotektant v opalovacích krémech a pleťových vodách nebo v pekárenském průmyslu. V mnoha zemích bylo použití kyseliny ferulové jako potravinářské přísady schváleno, protože účinně odstraňuje superoxidový aniontový radikál a inhibuje peroxidaci lipidů.

Co se týká kosmetiky, tak tvorba reaktivního kyslíku je hlavní příčinou poškození kůže. Během expozice záření foton interaguje s kyselinou trans-urokanovou v kůži a vytváří singletový kyslík, který může aktivovat celou kaskádu volných radikálů kyslíku oxidací bílkovin nukleových kyselin a lipidů, což vede ke změnám fotosyntézy a rakovině kůže. Kyselina ferulová silně absorbuje UV záření, je podobná tyrosinu a předpokládá se, že inhibuje tvorbu melaninu prostřednictvím kompetitivní inhibice tyrosinu. Poskytuje značnou ochranu pokožce před UVB a UV zářením. Používá se samotná nebo v kombinaci s vitaminem E a C, čímž se její účinky několikrát znásobí [27].



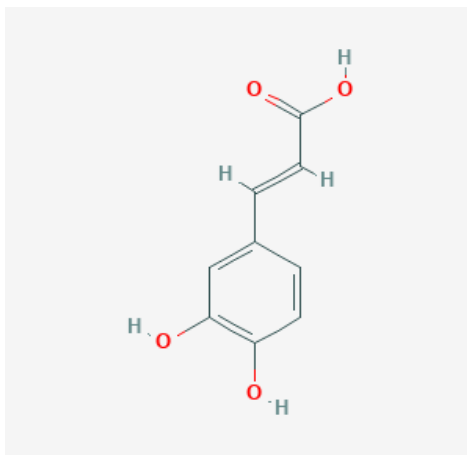
Kyselina ferulová [28]

Kyselina kávová

Kyselina kávová je produkována rostlinami a považována za farmakologicky bezpečnou organickou sloučeninu s antikarcinogenními, antimikrobiálními, protizánětlivými, antioxidačními a imunomodulačními účinky [29]. Je získána z fenylypropanoidu a je také prekurzorem fenethylesteru, což je sloučenina s potenciálem jako antidiabetikum a činidlo chránící játra. Její přítomnost souvisí s výskytem kyseliny chinové v kyselině chlorogenové nacházející se v kávě.

Antioxidační vlastnosti kyseliny kávové umožňují její široké využití v potravinářském, kosmetickém a lékařském průmyslu. Používá se buď jako přísada, která zabraňuje oxidaci složek v kosmetických přípravcích, nebo jako klíčová složka v některých jiných produktech, kde je přítomna jako volná kyselina nebo jako fenyl-ethylester.

Kyselinu kávovou lze získat také deesterifikací kyseliny chlorogenové, při čemž vzniká kyselina chinová jako vedlejší produkt [30].



Kyselina kávová [31]

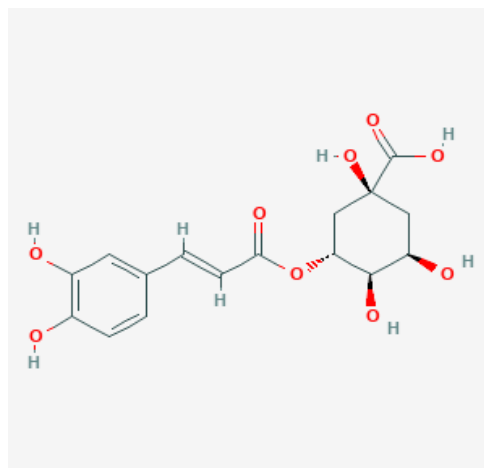
Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová byla izolovaná ze zelených kávových bobů, ale nachází se i u semen a listů mnoha rostlin. Je tepelně nestabilní a snadno se rozkládá na kyselinu chinovou a kyselinu kávovou [32].

Kyselina chlorogenová představuje 5-10 % kávových zrn, což je větší množství než kofein (1-2 %). Silně ovlivňuje chuť kávy, jako jsou slané, sladké a kyselé chutě, které se mění koncentrací. To je také považováno za původ nepříjemné komplexní chuti nalezené po prodloužení vaření. Vytvoří zelenožluté sloučeniny v přítomnosti Fe (III) iontů a díky své schopnosti zachytit radikály se očekává antioxidační aktivita [32].

Kyselina chlorogenová má četné účinky na zdraví. Běžně se prodávají doplňky kyseliny chlorogenové ve zdravotnictví. Je považována za antihypertenziva, má antivirové a antibakteriální účinky a může snížit riziko rakoviny, srdečních onemocnění a diabetu 2. typu, jelikož zpomaluje uvolňování glukózy do krevního oběhu [33].

Díky své antioxidační aktivitě se používá v kosmetice, kde pomáhá stimulovat a obnovovat rovnováhu unavené pleti, v tělových krémech při vmasírování do pokožky uvolňuje přebytečnou tekutinu pod kůží a zlepšuje cirkulaci. Ve spolupráci s kofeinem tónuje pleť a navozuje hladký a mladistvý vzhled [34].



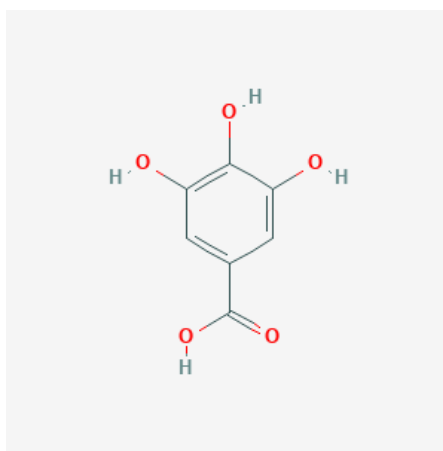
Kyselina chlorogenová [35]

Kyselina gallová

Kyselina gallová neboli kyselina hydroxybenzoová je přírodní antioxidant, označený jako GRAS (obecně uznávaný jako bezpečný) [36, 37]. Nejvíce se vyskytuje v červených plodech, černé ředkvičky a v cibuli, důležitým zdrojem jsou také čajové lístky.

Bylo prokázáno, že vykazuje biologickou aktivitu včetně protirakovinných látek. Kyselina gallová indukuje apoptózu rakovinných buněk cestami zprostředkovanými mitochondriemi a vykazuje selektivní toxicitu pro rakovinné buňky bez poškození normálních buněk [38]. Kromě antioxidantních a protinádorových vlastností má ještě vlastnosti antivirové, protizánětlivé a antimikrobiální. Využívá se jako zdroj materiálu pro inkousty a barvy a jako antioxidant v potravinách, v kosmetice a ve farmaceutickém průmyslu [37, 38].

V kosmetice byl široce používán jako náhražka hydrokortizonu u dětí s atopickou dermatitidou, při hojení ran, hyperpigmentaci a byly u něj prokázány velmi dobré účinky proti stárnutí pokožky. U citlivých jedinců může způsobit alergii [37].



Kyselina gallová [39]

2.2.9.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou všudypřítomnou skupinou přirozeně se vyskytujících polyfenolických sloučenin [40]. Obsahují v molekule dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkatým řetězcem v uspořádání C6-C3-C6. Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2H - chromenu substituovaného v poloze C-2 fenylovou skupinou, který se nazývá flavan a strukturu flavanu tvoří dvě benzenová jádra spojená heterocyklickým pyranem.

Podle stupně oxidace C3 řetězce a jeho substituce rozeznáváme základní struktury flavonoidů:

- Leukoanthokyanidiny
- Katechiny
- Flavanony
- Flavanonoly
- Flavony
- Flavonoly
- Anthokyanidiny

Ze strukturně příbuzných sloučenin, u kterých jsou dva kruhy spojeny alifatickým C3 řetězcem nebo řetězcem, který je částečně součástí uranového cyklu, se dále rozeznávají:

- Chalkony
- Dihydrochalkony
- Aurony

Méně běžné substituenty 2H-chromenu v poloze C-3 fenylovou skupinou se nazývají isoflavonoidy a pokud je spojení v poloze C-4, jsou sloučeniny odvozené od neoflavanu a nazývají se neoflavonoidy [16].

Bylo zjištěno více než 8000 sloučenin s flavonoidní strukturou, z nichž mnohé jsou odpovědné za atraktivní barvy květů, ovoce a listů. V rostlinách poskytují tyto sloučeniny ochranu proti ultrafialovému záření, patogenům a býložravcům [40]. Nejvíce rozšířené v přírodě jsou flavonoly [16].

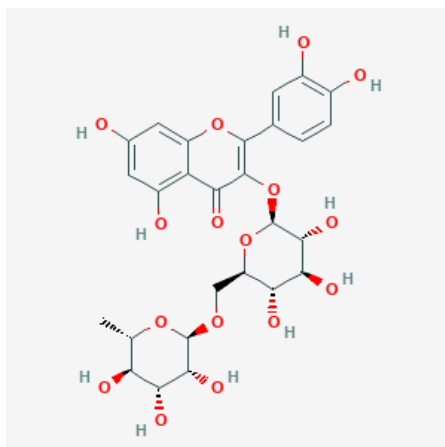
Flavonoidy mají velmi silné antioxidační, antibakteriální, antivirové, protizánětlivé účinky a pomáhají při kardiovaskulárním onemocnění [40].

Rutin

Rutin je flavonolový glykosid obsahující kvercetin a disacharidovou rutinózu (ramnózu a glukózu). Nachází se v mnoha rostlinách, ovoci a zelenině. Nejbohatším zdrojem rutinu je pohanka. Jeho barva je světle žlutá a je málo rozpustný ve vodě [41].

Rutin má silné antioxidační, protizánětlivé a hojivé účinky. Dokáže vázat kovové ionty, jako je železo, čímž snižuje Fentonovou reakci, při které vznikají škodlivé kyslíkové radikály. Také stabilizuje vitamín C a chrání jej proti degradaci. Proto je výhodné užívat vitamin C společně s rutinem [41].

Rutin se také používá k ošetření pokožky trpící na popraskané žilky, jelikož jeho nedostatek popraskané žilky způsobuje. Rutin podporuje tvorbu elastinu v cévách a působí proti jejich lomivosti. Najdeme ho také v různých potravinách a doplncích stravy [42].



Rutin [43]

2.3 Struktura pokožky

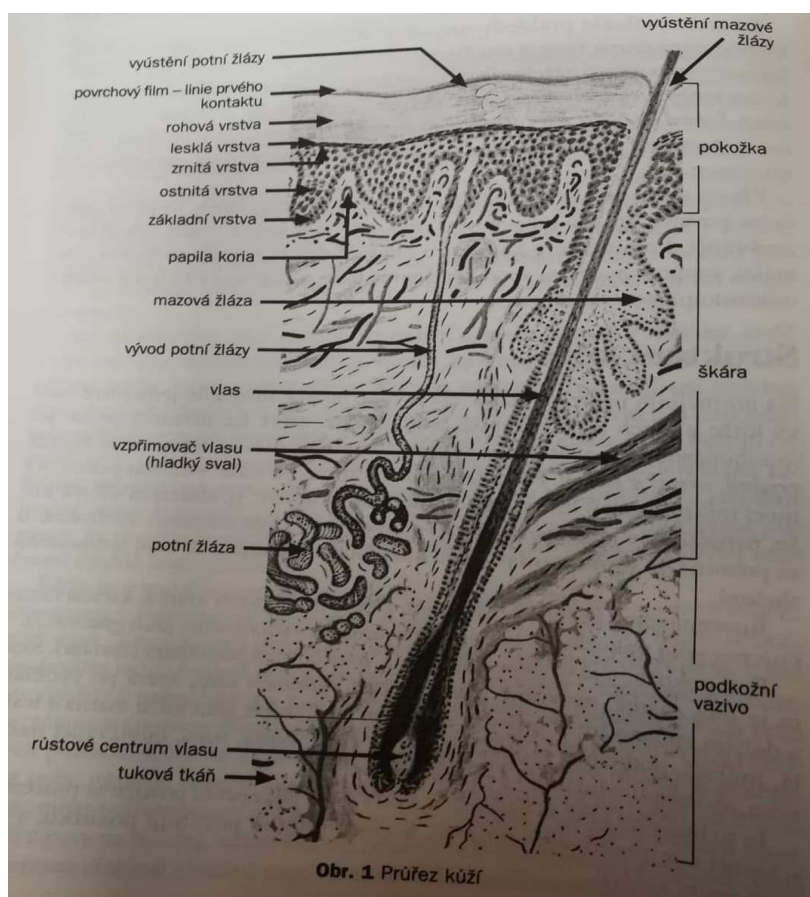
Kůže je důležitý orgán, který působí jako první obranná linie našeho těla proti bakteriím a virům. Zdravá kůže také udržuje optimální hladinu vody a pomáhá regulovat tělesnou teplotu. Je vysoce citlivá a registruje i ten nejjemnější dotek či bolest. Je to náš největší a nejviditelnější orgán s plochou téměř 2 m² a tvoří skoro šestinu naší tělesné hmotnosti [44]. Neporušená kůže je u všech savců základní podmínkou života. Její propustnost pro látky z vnějšku i z vnitřku organismu je omezená a přísně regulovaná [45].

2.3.1 Struktura pokožky

Kůže je měnící se, dynamický orgán, který se skládá ze tří hlavních funkčních vrstev [44].

Rozeznáváme zevní část složenou z řady buněčných vrstev, kterou označujeme jako pokožku – epidermis. Pod pokožkou je vazivová část kůže, označovaná jako škára – dermis, která bývá jako první postižena procesem stárnutí a je podkladem projevů, které druhotně postihují pokožku, a tím i její zevní vzhled. Nejhlubší částí kůže je podkožní vazivo – hypodermis zprostředkující spojení kůže s povázkami svalů nebo s okosticí [45].

Každá z těchto vrstev se skládá z několika dílčích vrstev a kožní přívesky jako jsou folikuly a mazové a potní žlázy také hrají v její celkové funkci svou roli [44].



Obrázek 4 Struktura kůže [45]

2.3.1.1 *Epidermis*

Epidermis je nejvrchnější vrstva, kterou můžeme vidět a dotknout se jí. Chrání před toxiny, bakteriemi a ztrátou vody. Je složena z 5 vrstev keratinocytů. Tyto buňky, vyprodukované v nejspodnější bazální vrstvě epidermis, se posouvají směrem k povrchu kůže. Při tom dozrávají a procházejí řadou změn. Tento proces, který je znám jako keratinizace (nebo rohovění), odlišuje jednotlivé podvrstvy [44].

- **Bazální vrstva – stratum basale**

Poslední tzv. základní vrstva je tvořena jednou vrstvou cylindrických buněk umístěných na zvlněné bazální membráně oddělující pokožku od škáry. Tyto buňky obsahují jádro a veškeré orgány, mitoticky se dělí a slouží jako zásobárna pro postupně odrůstající a dozrávající buňky horních částí pokožky [46].

- **Vrstva ostnitých buněk – stratum spinosum**

Vrstva ostnitých buněk je tvořena 4–8 vrstvami polygonálních buněk navzájem spojených buněčnými můstky. Tyto buňky obsahují jádra a veškeré buněčné orgány. V prostoru mezi buňkami cirkuluje tkáňový mok [46].

- **Vrstva zrnitých buněk – stratum granulosum**

Zde začíná proces keratinizace. Buňky produkují tvrdé granulární struktury a při vyzrávání směrem k povrchu se tyto granule přeměňují na keratin a epidermální lipidy [44].

Obsahuje 1–2 vrstvy plochých buněk, obsahující plochá jádra vyplněná zrny keratohyalinu, prekurzoru keratinu [46].

- **Vrstva jasných buněk – stratum lucidum**

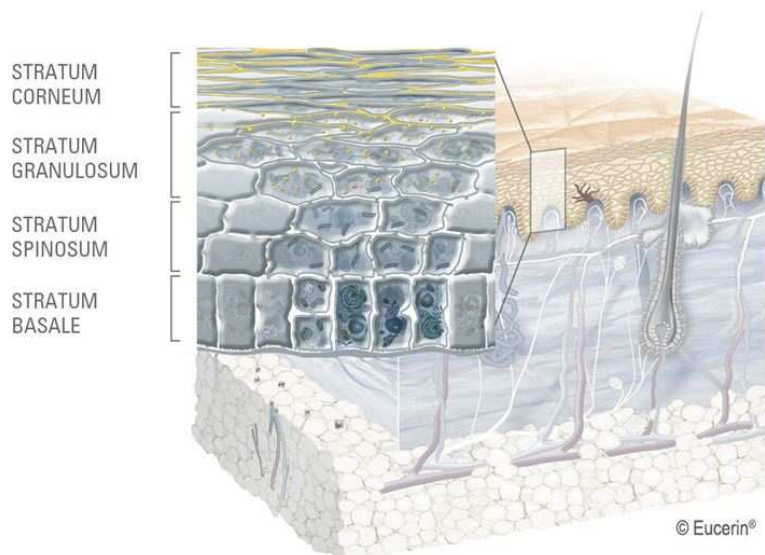
Bezjaderné buňky jsou pevně stlačeny k sobě a zploštěny [44, 46].

- **Rohová vrstva – stratum corneum**

Horní vrstva epidermis se podle tělesné partie, v níž se nachází, skládá v průměru z přibližně 20 vrstev zploštělých, odumřelých buněk vyplněných keratinem.

Mezi nimi se nachází mezibuněčná hmota, skládající se z 9 typů ceramidů (45 až 50 % hmoty), cholesterolu (25 % hmoty), volných mastných kyselin (10–15 % hmoty) a dalších látek, z nichž nejdůležitější je cholesterol sulfát.

V dolní části je rohová vrstva kompaktní, v horní části dochází k odlupování rohových buněk, jež se stávají součástí kyselého filmu na povrchu kůže [46]. V rohové vrstvě se také nacházejí póry potních žláz a ústí mazových žláz [44].



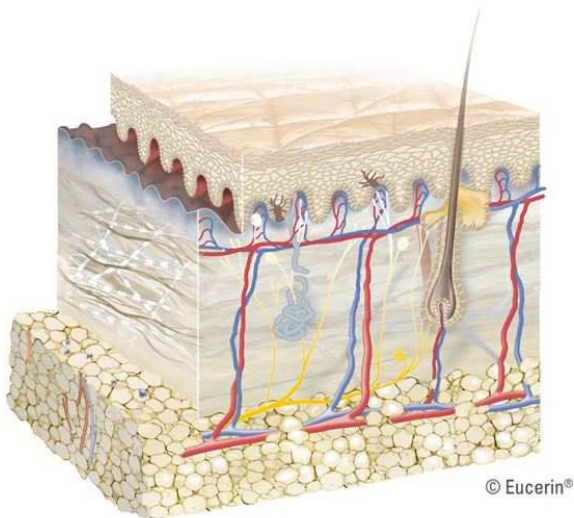
Obrázek 5 Struktura epidermisu [44]

2.3.1.2 Dermis

Dermis hraje klíčovou roli v ochraně těla před vnějšími vlivy a dráždivými látkami, stejně jako ve vyživování epidermis.

Hlavní stavební složky dermis jsou kolagen, elastin a pojivová vlákna. Tato vlákna jsou obklopena gelovitou hmotou s obsahem kyseliny hyaluronové, která má vysokou schopnost vázat vodu a pomáhá udržet objem kůže.

V případě, že dojde k poškození kůže, obsahuje pojivová vlákna, jako jsou fibroblasty a mastocyty, které hojí rány. Také je bohatá na krevní cévy, které vyživují epidermis a odstraňují škodlivé látky. V dermis se také nachází mazové a potní žlázy. Tekutiny vylučované těmito žlázami vytváří hydrolipidický film. Kromě mazových a potních žláz, dermis obsahuje také lymfatické cévy, smyslové receptory a vlasové kořínky [44].



Obrázek 6 Struktura dermisu [44]

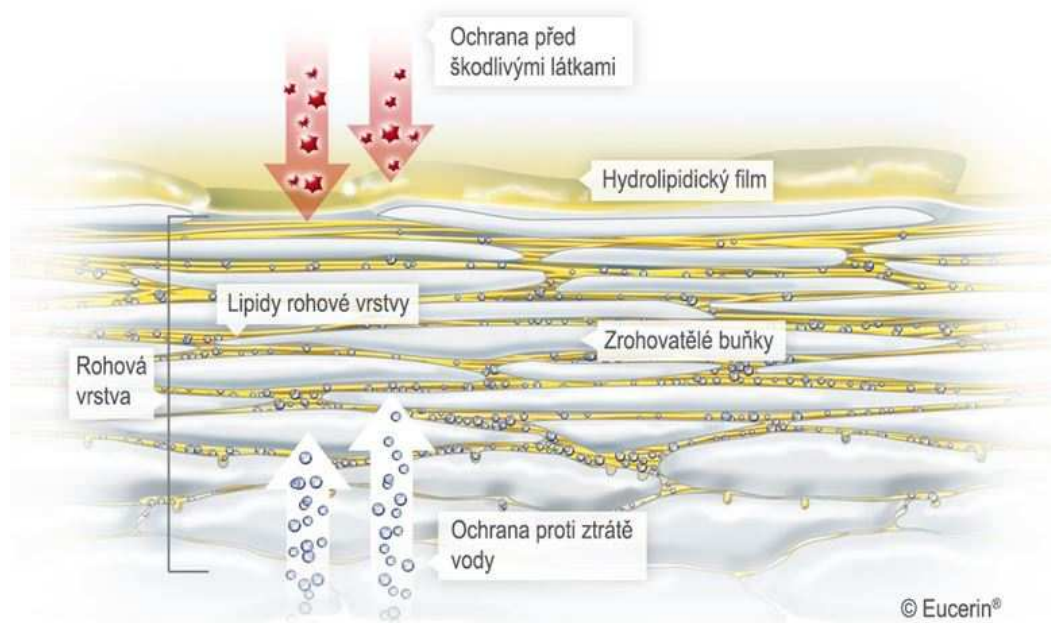
2.3.1.3 Hypodermis

Nejspodnější vrstva kůže uchovává energii a zároveň působí jako tlumič nárazů a izolace těla. Skládá se převážně z tukových buněk – adipocytů, které jsou shluklé do tukových polštářků, speciálních kolagenních vláken, tvořícími septa nebo hranice, dále volná a houbovitá pojivová vlákna, která drží pohromadě tukové buňky a v neposlední řadě obsahuje krevní cévy [44].

2.3.1.4 Hydrolipidický film

Je vytvářen produkty mazových žláz, potních žláz i olupujícím a rozpadajícím se povrchem rohové vrstvy a tvoří tak specifické hraniční prostředí. Hodnota pH tohoto filmu se udává mezi 4,5 až 5,5 a třebaže nemá na celém těle stejnou kvalitu, má mnohostranný význam [45]. Obsahuje aminokyseliny, volné mastné kyseliny, kyselé produkty látkové výměny včetně kyseliny mléčné kyselinu pyrolidin-karboxylovou a jiné přirozené hydratační faktory, které jsou převážně vedlejší produkty procesu keratinizace [44, 45]. Pro vysoký obsah lipidů se tento film označuje jako lipidový [45].

Optimální kyselost kožního povrchu by měla odpovídat izoelektrickému bodu rohoviny tvořící zevní vrstvu pokožky. Vedle míry kyselosti je vzájemnou souhrou sekrece mazových a potních žláz a produkty rohovění výsledkem i komplex látek označovaný jako hydratační faktor, což je komplex udržující v pokožce optimální množství vody [45].



Obrázek 7 Struktura kůže, hydrolipidický film [44]

2.3.2 Transdermální absorpce

Z pohledu vstupu chemických látek do organismu je důležitý rozdíl mezi charakterem hydrofobní rohové vrstvy a charakterem ostatních vrstev pokožky, jež jsou hydrofilní. Hlavní bariérou proti průniku látek z prostředí do organismu transdermální cestou je rohová vrstva.

Chemické látky mohou pronikat do organismu transcelulární cestou, intercelulární cestou, vlasovými folikuly, mazovými žlázami a vývody potních žláz. Většina látek prochází intercelulární cestou přenosu, tj. mezibuněčnými prostory, a menší množství látek prochází transcelulární, tj. přes těla buněk rohové vrstvy (korneocytů) a buněk zbývajících vrstev pokožky (keratinocytů).

Průnik látek kůží je obvykle považován za proces pasivní difuze. Někteří autoři se domnívají, že se kromě pasivní difuze uplatňuje i vliv nasávání látky, vyvolaný pod tlakem vznikajícím při odvádění tkáňové tekutiny a krve ze škáry. Z tohoto důvodu byla vyvinuta varianta experimentálního testování absorpce látek na perfundovaném kousku kůže.

Nejlepší variantou pro testování transdermální absorpce chemických látek přes absorpční membránu in vitro je lidská kůže. Alternativou ke kůži lidské je kůže prasečí, která je lidské kůži velmi blízká svojí anatomii, fyziologií a chemickým složením. Nejčastěji se odebírá ze zad, boků, břicha nebo ušního boltce [46].

2.3.3 Prostup fenolických látek kůží

Propustnost sloučenin skrze kůži závisí na biologických faktorech (věk, stav kůže, kardiovaskulární funkce a metabolismus), dále na rozdělovacím koeficientu mezi stratum corneum a transportérem a v neposlední řadě na lipofilnosti, velikosti molekuly, polaritě a zatížení.

Propustnost fenolické sloučeniny závisí na podtřídě fenolických sloučenin, ke kterým příslušná sloučenina patří, na molekulární velikosti, struktuře a na tom, zda se vyskytuje v glykosidové nebo aglykonové formě.

Jelikož kůže působí jako bariéra, většina účinných látek dodávaných lokálně na kůži má nízkou přirozenou propustnost. Aby se zvýšila propustnost aktivních sloučenin, bylo použito řady fyzikálních metod (tj. okluzivní obvazy, elektroporace a další) a chemických metod (včetně přidání chemických sloučenin, které interagují se složkami kůže, které způsobují reverzibilní modifikace narušení funkce bariéry a vedoucí ke zvýšení její propustnosti).

Zlepšení lokální absorpce lze zlepšit nově vyvinutými enkapsulačními přístupy, jako jsou lyposomy, nanoemulze, mikroemulze a další [47].

2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC byla nejprve využívána na oddělení rostlinných pigmentů, nicméně od té doby se stala důležitou součástí mnoha průmyslových odvětví. HPLC se využívá ve farmaceutickém vývoji, k čištění sloučenin, na kontrolu kvality, potravin, léků nebo škodlivých látek a v neposlední řadě je také spolehlivým způsobem identifikace sloučenin [48].

2.4.1 Historie HPLC

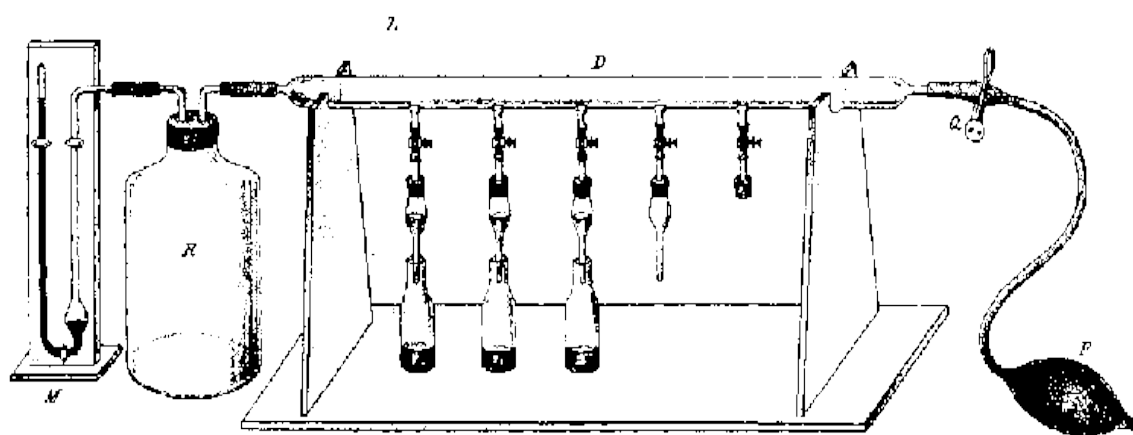
Historie HPLC začala na počátku 20. století v roce 1903. Právě tehdy objevil ruský botanik Michail Cvět nový způsob separace rostlinných pigmentů.

Oddělil rostlinné pigmenty skleněnou trubičkou naplněnou práškovou křemelinou, která fungovala jako původní stacionární fáze. Na rozdíl od současných metod HPLC, Tsvet neposílal sloučeniny přes stacionární fázi. Tato časná forma chromatografie používala pouze gravitaci, aby pomohla sloučeninám procházet přes stacionární fázi.

Každý oddělený pigment měl také jinou barvu, což je důvod, proč Cvět pojmenoval tuto techniku chromatografií, protože "chroma" znamená barvu.

Ve čtyřicátých letech Archer Martin a Richard Synge vyvinuli nový přístup k chromatografii, který namísto jedné použil dvě kapalně fáze. To pomohlo oddělit sloučeniny s různými rozdělovacími koeficienty a položilo základy pro vývoj vysoce výkonné kapalinové chromatografie.

Během sedmdesátých let minulého století byly vyvinuty čerpadla, které pomáhají vytlačovat kapalnou fázi a sloučeniny do stacionární fáze [48].



Obrázek 8 Historický přístroj pro kapalinovou chromatografii [49]

2.4.2 Princip HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se řadí mezi analytické separační metody a využívá se k separaci široké škály analytů. Během analýzy dochází k distribuci analytu mezi mobilní a stacionární fázi. Čas strávený v jedné nebo druhé fázi závisí na afinitě analytu k dané fázi.

Čím delší čas stráví analyt ve stacionární nepohyblivé fázi, tím později je eluován. Látky s nulovou afinitou ke stacionární fázi nejsou v chromatografické koloně zadržovány a jsou eluovány v tzv. „mrtvém objemu“. Naopak látky s vysokou afinitou vůči stacionární fázi jsou v koloně zadržovány dlouho a v některých případech nejsou z kolony eluovány. Hlavním hnacím mechanismem separačního procesu je opakovaná adsorpce analytu na rozhraní obou fází [50].

Separace a eluce jednotlivých složek směsi je ovlivněna jak povahou stacionární fáze, tak povahou mobilní fáze. Eluce může být buď provedena mobilní fází o konstantním složení při použití isokratické eluce nebo mobilní fází o zvyšující se eluční síle při gradientové eluci, kdy je složení mobilní fáze programově měněno během eluce ve prospěch silnější eluční složky. Isokratická eluce je vhodná, mají-li látky podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Gradientová je vhodná naopak pro látky, které mají výrazně rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti [51].

Separované zóny analytů vycházející z kolony jsou zaznamenány při průchodu detektorem a signál je převeden do podoby chromatografického záznamu, neboli chromatogramu. Chromatografický záznam je charakteristický křivkami gausovského tvaru, které jsou nazývány píky, neboli eluční křivky.

2.4.2.1 Stacionární fáze

Stacionární fáze funguje jako nepohyblivá složka chromatografického systému. Stacionární fázi může být tuhá látka nebo film kapaliny zakotvený nebo chemicky navázaný na tuhou matici, která je navázaná na nosič. Jako nosič se nejčastěji používá silikagel, jehož povrchové hydroxylové skupiny se modifikují příslušnou chemickou reakcí s vhodnými organickými sloučeninami (ligandem), na jejichž charakteru závisí selektivita připravené fáze [51].

Rozčlenění stacionárních fází v HPLC není v současné době snadné. Nejstarší členění je podle jejich skupenství na tuhé a kapalné, dalším logickým členěním je členění na fáze polární, nepolární a amfoterní [51].

Stacionární fáze mohou být také rozčleněny podle chromatografického modu, který je použit pro separaci na:

- **Normální**

Stacionární fáze je polární a největší retenci (vysokou afinitu) k nim mají polární analyty. Jako mobilní fáze se zde využívají rozpouštědla jako je hexan, heptan, isooktan v kombinaci s isopropanolem, ethyl-acetátem nebo chloroformem [52].

- **Reverzní**

Na nepolární stacionární fázi (např. na oktadecylovaném silikagelu) je chování analytů je opačné vzhledem k chování na silikagelu. Jako mobilní fáze se používá směs polárních

rozpouštědel, například voda-metanol, voda-acetonitril, voda-isopropylalkohol. Vodná složka může obsahovat rozpuštěnou látku, například sůl nebo kyselinu [52].

- Ionexy
- HILIC

Separace využívají vodné roztoky organických rozpouštědel jako mobilní fázi společně s více polární fází stacionární.

- HIC

Separace je založena na interakci nepolární stacionární fáze a hydrofobních částí analytu.

Dále jsou stacionární fáze rozděleny podle jejich chemického složení na:

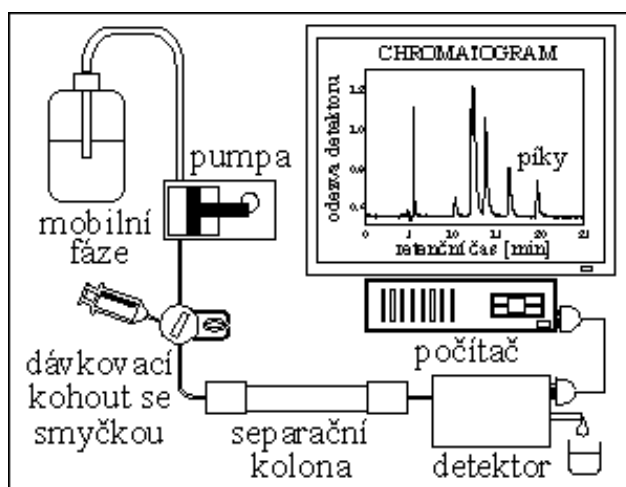
- Anorganické oxidy, mezi které patří silikagel, oxid zirkoničitý, hlinitý a titaničitý)
- Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu
- Polymerní
- Hybridní

2.4.2.2 Mobilní fáze

Mobilní fází je kapalina, která je kolonou protlačována pomocí vysokotlaké pumpy za vysokého tlaku. Mobilní fází může být voda, vodný roztok anorganické či organické soli, kyseliny, pufr či směs vody/vodného roztoku a/nebo organických rozpouštědel. Ve speciálních případech se přidávají do mobilní fáze modifikátory, například pro chirální separace či micelární chromatografii [50].

2.4.3 Instrumentace HPLC

Mobilní fáze je vedena přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony, která je přímo spojena s detektorem, za nějž může být při výstupu zařazen ještě sběrač jednotlivých frakcí [51].



Obrázek 9 Schéma HPLC [53]

Kapalinový chromatogram se skládá z těchto částí:

- **zařízení pro uchování a transport mobilní fáze (vysokotlaké čerpadlo)**
- **zařízení pro dávkování vzorku**
- **zařízení pro separaci látek (chromatografická kolona, termostat kolony)**
- **zařízení pro detekci látek, popř. sběrač frakcí [50]**

2.4.3.1 Transport mobilní fáze

Do této části chromatografu mohou být zařazeny zásobníky mobilní fáze, odplyňovač, vysokotlaké čerpadlo, tlumič pulsů a směšovače mobilních fází.

V zásobníku mobilní fáze jsou umístěny speciální filtry pro zachycení suspendovaných částic před vstupem do HPLC systému. Zásobníky musí být uzavřeny tak, aby její páry neunikaly do okolní atmosféry, a také aby nebyla kontaminovaná z okolního prostředí. Spojení zásobníku mobilní fáze s odplyňovačem, směšovačem a vysokotlakým čerpadlem jsou zhotoveny většinou z teflonu nebo z nerez oceli [51].

Odplynění mobilní fáze

Mobilní fáze musí být odplyňovaná hlavně proto, aby při změně tlaku na výstupu z chromatografické kolony nebo i v koloně nedocházelo k uvolňování bublinek rozpuštěných plynů.

Odplynění mobilní fáze je jedním ze zásadních způsobů eliminace problému jako jsou:

- Nestabilita základní linie a tím i snížení citlivosti detekce
- Neopakující se retenční časy
- Špatná opakovatelnost dávkovaného objemu vzorku
- Nestabilita provozu čerpadel

Plyny rozpuštěné v mobilní fázi mají vliv na funkci vysokotlakého čerpadla, kdy dochází k uvolňování bublin v sacích ventilech a k zavzdušnění hlavy pumpy. Průtok mobilní fáze pak není bezpulsný a opakovatelný a důsledkem je kolísání tlaku v systému.

V současné době jsou používány dva principy odplynění mobilní fáze, a to probublávání heliem nebo vakuový degaser. Používá se také kombinace vakuového odplynění a ultrazvuku [51].

Vysokotlaké čerpadlo

Čerpadlo musí zajistit stabilní a bezpulsný průtok mobilní fáze. Materiály, ze kterých jsou čerpadla vyrobena, by měla být z nerezových materiálů, případně ze speciálních plastů, aby nedocházelo k poškození při použití agresivních mobilních fází. Tlaky na výstupu z čerpadel se mohou pohybovat v rozmezí 1–100 MPa [51].

Rozlišujeme několik konstrukčních typů čerpadel:

- **Pneumatická čerpadla**

Pneumatická čerpadla patří mezi čerpadla pracující za konstantního tlaku. Síla potřebná k pohybu kapaliny je vyvolaná tlakem plynu, který působí na stlačitelný zásobník mobilní fáze přes píst či membránu. Regulace průtoku mobilní fáze je možná změnou tlaku plynu.

Tato čerpadla jsou vhodná pouze pro techniku SEC (size exclusion chromatography).

- **Čerpadla injekčního typu**

Tlak na píst v těchto čerpadlech je vyvíjen speciálním krokovým elektromotorem. Píst je s elektromotorem propojen táhlem se závitem a převodovkou, která zajišťuje rychlý zpětný chod pístu při plnění pracovního válce mobilní fází.

Jejich nevýhodou je jimi limitovaný objem mobilní fáze daný objemem pracovního válce, a dále čas potřebný k dosažení stabilního průtoku mobilní fáze.

- **Pístová čerpadla**

Konstrukce pístových čerpadel je taková, aby byl mrtvý objem čerpadla, co nejmenší. Pro tato čerpadla je typická pulsní charakteristika a objemového průtoku v závislosti na čase.

Výhodou pístových čerpadel je neomezené dávkování mobilní fáze na kolonu bez přerušení toku. V důsledku malého vnitřního objemu lze mobilní fázi v čerpadle snadno vyměnit. Nevýhodou je kolísání tlaku mobilní fáze s časem tak, jak se střídá sací a výtlačná fáze.

- **Membránová čerpadla**

Tento typ čerpadla je podobný jako pístové čerpadlo, avšak v hlavě čerpadla je membrána, která zajišťuje styk hydraulické kapaliny, kterou je nejčastěji olej, s mobilní fází.

Nevýhodou membránového čerpadla oproti pístovým čerpadlům je větší mrtvý objem.

- **Dvoupístová čerpadla zapojená do série**

U tohoto čerpadla je každý píst poháněn svým vlastním krokovým motorem. Díky tomu jsou oba dva písty na sobě navzájem nezávislé [51].

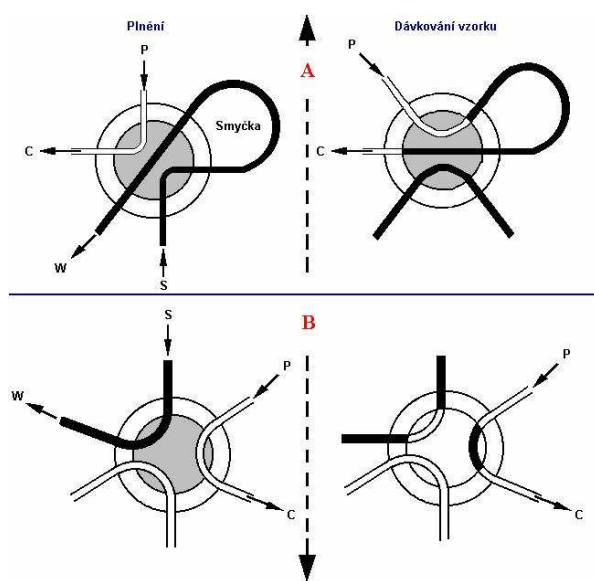
2.4.3.2 Dávkování vzorku

Účinnost chromatografického procesu je do jisté míry závislá i na dávkování vzorku na chromatografickou kolonu. Při nedokonalém dávkování může docházet k významnému rozmývání píků vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení, zejména při použití mikrokolon, kapilárních kolon a krátkých kolon.

Vysokotlaké dávkovací ventily

Dávkovací vysokotlaké ventily umožňují dávkovat i při tlaku 60 až 80 MPa a to buď konstantní objem vnitřního prostoru ventilu (obr.č.15 B) nebo při zařazení dávkovací smyčky objem smyčky (obr.č.15 A).

Dostupné dávkovače mají různé objemy dávkovacích smyček od 0,2 μl do 2 000 μl a mohou být ovládané elektricky nebo pneumaticky [51]. Dávkovač má dvě polohy, pokud je smyčka plněna, tak mobilní fáze je vedena ze zásobní láhve přímo na kolonu. Ve druhé, dávkovací poloze ventilu je vzorek mobilní fází vypláchnut ze smyčky do kolony a v ní separován [54].



Obrázek 10 Dávkovací smyčka, kde P – čerpadlo, C – kolona, W – odpad a S – vzorek [51]

Automatické dávkovače (autosamplery)

Autosamplery jsou automatické systémy dávkování vzorků. Vialky, malé nádobky s analyzovanými vzorky, jsou umístěny v termostatovaném prostoru. Z vialek jsou malé objemy vzorku dákovány na kolonu. Dávkuje se buď dávkovací smyčkou s fixním objemem nebo mikrostříkačkou [54].

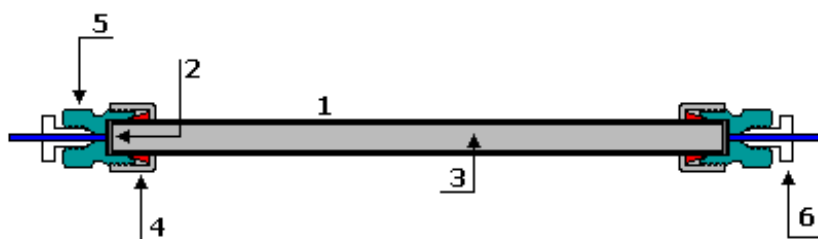
2.4.3.3 Chromatografická kolona

Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Plášť kolony má za úkol držet pohromadě stacionární fází, přičemž plášť kolony musí být chemicky inertní, musí odolávat poměrně vysokým tlakům a vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký. Nejvíce používaný materiál k výrobě kolon je nerezová ocel, která je vysoce antikorozivní.

Každá kolona je složena ze dvou částí – vlastní tělo kolony, kterým je v podstatě rovná trubice s hladkým vnitřním povrchem, a koncovka kolony. Koncovka musí zajistit těsnost

systému v oblasti tlaků používaných v HPLC, distribuovat mobilní fázi i analyt vždy rovnoměrně přes celý průřez chromatografického lože a zadržovat náplň kolony.

Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2), která zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavicí (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6) [51].



Obrázek 11 Chromatografická kolona [51]

Ke spojení kolony s dávkovačem a detektorem jsou používány kovové nebo polyethererketonové (PEEK) kapiláry a hydraulické spojky [51].

2.4.3.4 Detektory

Detektory jsou umístěny na konci kolony a analyzují efluent. Detektory zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku celou detektoru.

Detektory se nejčastěji dělí na detektory koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v efluentu dm/dV nezávisle na přívodu složky do detektoru. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky v efluentu dm/dt do detektoru.

Měřený signál je různým způsobem ovlivněn objemovou rychlostí toku mobilní fáze celou detektorem, teplotou, napětím v síti nebo nečistotami v mobilní fázi. Obecně se těmto chybám říká náhodný šum. Šum na základní linii je tedy krátkodobá změna základní linie způsobená změnou elektrického signálu. Je to faktor, který limituje citlivost detektoru. Výška jednoznačně

detekovatelného píku musí být dvojnásobek šumu základní linie. Ke kvalitativnímu určení se obvykle pokládá výška píku (mez detekce) trojnásobku šumu a ke kvantitativnímu stanovení musí být výška píku desetinásobek šumu. Měřený signál se skládá z užitečného, koncentrací analytu podmíněného signálu a z poruch, které jsou způsobeny náhodnými nebo soustavnými vlivy v přenosovém signálu [51].

Spektrofotometrické detektory

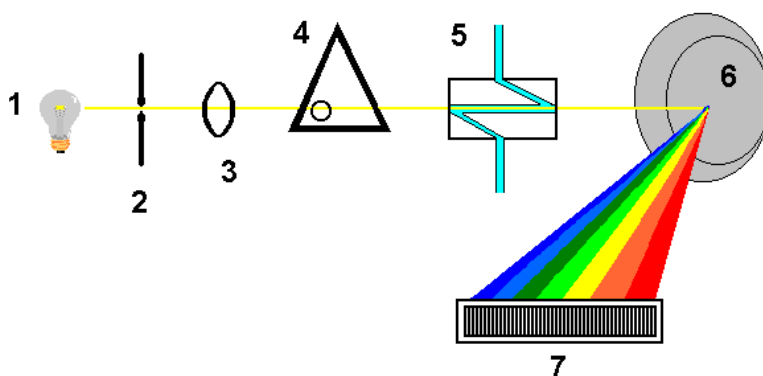
Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy, koncentrací absorbující složky a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance.

Podle konstrukčního uspořádání mohou spektrofotometrické detektory být rozděleny na čtyři typy:

- Detektory s diodovým polem
- Detektory s fixní vlnovou délkou
- Detektory s měnitelnou vlnovou délkou
- Detektory s programovatelnou vlnovou délkou

V současné době je nejvíce využíván detektor s diodovým polem. Tento typ může snímat celé UV-VIS spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Záření ze zdroje po průchodu měrnou celou detektoru je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí analytu. Nastavený výsek spektrálního rozsahu, případně celý rozsah je ukládán v počítači. Chromatografickou separaci je možno sledovat na obrazovce při jedné nebo několika zvolených vlnových délkách. Separovaný analyt je možno identifikovat podle jeho spektra, které je uloženo v knihovně spekter, v kombinaci s retenčním časem standardu.

Na následujícím obrázku 12 je uveden jednoduchý náčrt detektoru s diodovým polem.



Obrázek 12 Schéma detektoru s diodovým polem. [1] deuteriová výbojka, [2] štěrbina, [3] čočka, [4] clona, [5] průtoková Z-cela detektoru, [6] konkávní holografická mřížka, [7] diodové pole

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Přístroje

- Spektrofotometr Helios Gamma & Delta Spectronic Unicam, USA
- Analytické váhy A&D Instruments LTD, HR-120-EC, Japonsko
- Mikropipety Biohit a Thermo Scientific, USA
- magnetické míchadlo FISHER
- chladnička Liebherr, Česká republika
- Přístroj na úpravu vody PURELAB® Classic ELGA, Velká Británie
- Ultrazvuková lázeň Kraitex, Slovensko
- Kapalinový chromatograf Shimadzu LC-10AD, Japonsko
 - termostat kolony, Shimadzu Column oven CT-10A
 - DAD detektor, Shimadzu DAD SPD-M10AVP
 - čerpadlo, Shimadzu Pump GT-104
 - řídicí jednotka, Shimadzu Communication bus module CBM-10A
 - degasser, Shimadzu FCV-10AL
 - předkolona MetaGuard 4,6 mm Polaris 5U, C18-A, Labicom s.r.o.
 - kolona Supelcosil LC-18-DB o rozměrech 250 x 4,6 mm
- Filtr stříkačkový VWR Nylon 0,45 µm, 25 mm
- Rotační vakuová odparka IKA® WERKE RV 06, Německo

3.1.2 Chemikálie

- Uhličitan sodný bezvodý, Lachema, Česká republika
- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina chlorogenová, Sigma Aldrich, India
- Kyselina trans-ferulová $\geq 99 \%$, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina kávová $\geq 98 \%$, Sigma-Aldrich, USA
- Rutin hydrát $\geq 94 \%$, Sigma-Aldrich, USA
- Chlorid sodný min. 99,5% LACH-NER, Česká republika
- Methanol, LiChrosolv®, Německo
- Kyselina mravenčí, LACH:NER, Česká republika

3.1.3 Pomůcky a další příslušenství

- Sušené bezové květy z biosadu
- Sítko
- Franzova cela SES, Analysysteme GmbH, Německo
- Syntetické membrány (0,23 μm , 0,40 μm) Pragopor 8; Pragochema, ČR
- Jehly Santiago
- Injekční stříkačky Chirana, ČR, 5 ml
- Skalpel
- Vepřové ucho

3.2 Analyzované vzorky

Květy bezu černého pocházely z bioprodukce družstva Agrofrukt Hustopeče a byly sbírány v červnu 2018. Byly to tzv. druhé a třetí květy, tzn. rozkvétající až v pozdějších termínech, kdy většina květenství již obsahuje zelené zárodky plodů. Ponecháním druhých a třetích květů na stromku se oslabuje primární výnos bezinek.

Sesbírané druhé a třetí květy byly usušeny v sušárně léčivých bylin za teplot, které nepřekročily 40°C. Sbírána a sušena byla celá květenství, tj. pětičetné vrcholičnaté laty. Takto připravená droga byla použita k většině experimentů. Pro speciální experiment byly použity pouze vybírané suché květy bez stonků.

3.3 Ověření optimálních podmínek pro přípravu extraktu z černého bezu

3.3.1 Ověření navážky sušených květů

Do čtyř kádinek bylo naváženo 15; 20; 25 a 30 g sušených bezových květů, které byly přelity 200 ml vroucí vody. Zalité bezové květy byly extrahovány při laboratorních podmínkách 10 minut. Extrakt byl přeceděn přes sítko a poté přefiltrován přes Büchnerovu nálevku za sníženého tlaku.

3.3.2 Ověření extrakční teploty vody

Do šesti kádinek bylo naváženo 10 g sušených bezových květů, které byly zality 100 ml vody o rozdílné teplotě, a to 50; 60; 70; 80; 90 a 100 °C. Zalité bezové květy byly extrahovány při laboratorních podmínkách 10 minut. Extrakt byl přeceděn přes sítko a následně přefiltrován přes Büchnerovu nálevku za sníženého tlaku.

3.3.3 Příprava extraktu z různých částí květenství

Do čtyř kádinek bylo naváženo 10 g sušeného bezu v různém poměru z hlediska částí rostliny, a to pouze květy, květy spolu se stonky, pouze stonky a květy v čajovém sáčku. Zalily byly 100 ml vroucí vody a následně byly extrahovány při laboratorních podmínkách 10 minut. Extrakt byl přeceděn přes sítko a poté přefiltrován přes Büchnerovu nálevku za sníženého tlaku.

3.3.4 Příprava zahuštěného extraktu

Extrakt z bezových květů byl zahušťován vakuovou odparkou. Cílem bylo odpařit cca polovinu vody.

U extraktu byl změřen objem, poté byl nalit do baňky s kulatým dnem a se zábrusem. Následně byla baňka nasazena na zábrusové hrdlo vakuové odparky. Byla spuštěna vývěva, voda tekoucí do chladiče a pomocí ventilu byl přístroj odvzdušněn. Zároveň bylo zapnuto zahřívání vody v hrnci. Baňka byla do půlky ponořena do vodní lázně a bylo spuštěno otáčení hlavy s baňkou. Během odpařování byla kontrolována teplota vodní lázně a v případě silného varu bylo zařízení krátce zavzdušněno.

Po skončení odpařování bylo pomocí ventilu zařízení zavzdušněno a byly vypnuty přívody vody. Koncentrát i kondenzát byly po změření v odměrném válci přelity do připravených nádob pro následné analýzy.

3.4 Stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky

Nejprve bylo připraveno desetkrát zředěné Folin–Cioacaltauovo činidlo tak, že 10 ml činidla bylo doplněno destilovanou vodou do 100 ml odměrné baňky. Následně byl připraven nasycený roztok uhličitanu sodného tak, že bylo rozpuštěno 7,5 g uhličitanu sodného ve 100 ml destilované vody.

Zásobní standardní roztok kyseliny gallové o koncentraci $102 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven pro kalibraci. Jeho postupným ředěním pak byla sestavena kalibrační řada v rozmezí od $0,1 - 1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Postup pro přípravu kalibračních roztoků i měřených reálných vzorků byl stejný: Do zkumavek bylo pipetováno 1 ml destilované vody, 1 ml Folin–Cioacaltauova činidla a 100 μl kalibračního roztoku nebo měřeného vzorku. Připravené roztoky byly protřepány a nechány pět minut stát při laboratorní teplotě. Po pěti minutách byl přidán 1,0 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a obsah byl opět promíchán. Po 15 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Jako blank byla využita destilovaná voda. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Poté byla vypočtena průměrná hodnota.

Z regresní rovnice kalibrační křivky kyseliny gallové byl vypočítán obsah celkových fenolických látek, který byl vynásoben faktorem ředění a přepočítán na g/l.

3.5 Příprava roztoků standardů

Standardní roztok kyseliny chlorogenové:

Roztok kyseliny chlorogenové o koncentraci $0,1 \text{ g/l}$ byl připraven rozpuštěním $0,01 \text{ g}$ kyseliny chlorogenové v destilované vodě, následně byl kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou.

Standardní roztok kyseliny ferulové:

Roztok kyseliny ferulové o koncentraci $0,1 \text{ g/l}$ byl připraven rozpuštěním $0,01 \text{ g}$ kyseliny ferulové v destilované vodě, následně byl kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou.

Standardní roztok kyseliny kávové:

Roztok kyseliny kávové o koncentraci $0,1 \text{ g/l}$ byl připraven rozpuštěním $0,01 \text{ g}$ kyseliny kávové v destilované vodě, následně byl kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou.

Směsný standardní roztok kyselin ferulové, chlorogenové a kávové:

Tento směsný standardní roztok byl připraven smícháním výše uvedených tří standardních roztoků kyselin v poměru 1 : 1 : 1.

Standardní roztok rutinu:

Roztok rutinu o koncentraci $0,05 \text{ g/l}$ byl připraven rozpuštěním $0,005 \text{ g}$ v mobilní fázi, kvantitativně byl převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn po rysku mobilní fázi.

3.6 Difuzní cely

3.6.1 Příprava zásobního roztoku chloridu sodného

Pro přípravu fyziologického roztoku o koncentraci 0,15 M bylo rozpuštěno 0,88 g NaCl ve 100 ml deionizované vody. Tento roztok byl použit jako akceptorová tekutina ve Franzových celách a na každé měření byl připraven čerstvý.

3.6.2 Příprava kožních membrán

Pro testy in vitro na Franzových celách byly použity kožní membrány z vepřových uší. Vepřové uši byly získány od firmy Jatky Pohořelice, spol. s r.o. sídlící na adrese Brněnská 287, Pohořelice 691 23. Prasečí uši byly tepelně neošetřeny, netetovány a neporušeny.



Obrázek 13 Vepřové ucho

Ucho bylo seříznuto ručně pomocí skalpelu, byla oddělena tuková tkáň a chrupavka tak, aby byla získána co nejrovnější a nejdokonalejší membrána se zachovaným epidermis a dermis. Membrány byly čerstvé, maximálně do dvou dnů od porážky. Uši byly omyty destilovanou vodou a osušeny buničinou. Nebyly odchlupeny, aby byla co nejvěrněji napodobena lidská pokožka, na které se ochlupení také nachází.



Obrázek 14 Membrána z vepřového ucha

3.6.3 Sestavení měřicí aparatury (Franzovy cely)

Studium *in vitro* prostupnosti zvolených látek přes kůži bylo realizováno prostřednictvím Franzových difuzních cel, tedy vertikálních difuzních cel. K dispozici byly 2 tyto aparatury.

Nejdříve byly styčné plochy horní (donorové) a dolní (receptorové) natřeny inertní silikonovou pastou na zábrusy, aby testovaná membrána dobře přiléhala. Poté bylo do dolní komory vloženo magnetické míchadlo a mezi obě komory vložena membrána. Obě komory byly k sobě opatrně přichyceny svorkou, aby nadávkovaný vzorek nevytekl skrze špatně přichycenou membránu. Takto vytvořená aparatura byla položena na magnetickou míchačku. Pomocí dlouhé injekční jehly byla naplněna dolní komora 20 ml 0,15 M fyziologického roztoku. Dlouhou jehlu bylo třeba prostrčit až doprostřed dolní komory a poté ji pomalu celou naplnit tak, aby se těsně pod membránou nevytvořily žádné bublinky, které by mohly ovlivnit prostup dané látky.



Obrázek 15 Sestavená aparatura Franzovy cely s membránou z vepřového ucha

Do horní komory takto připravené aparatury bylo dávkováno asi 5 ml vzorku. Postupně byl testován prostup kyselin ferulové, chlorogenové a kávové. Jelikož fenolické látky na vzduchu velmi rychle oxidují, byl zvolen experiment s tzv. nekonečným dávkováním, proto na závěr po nadávkování vzorku byla horní komora překryta parafilmem a hliníkovou folií. Všechny experimenty probíhaly za laboratorní teploty a všechny experimenty byly provedeny třikrát.

3.6.4 Dávkování a odběr vzorků z/do difuzní cely

S využitím Franzovy cely byly postupně testovány tyto vzorky: standardní směs uvedených 3 kyselin v poměru 1:1:1, extrakt z bezových květů a zakonzentrovaný extrakt z bezových květů. Extrakty byly připraveny za optimálních podmínek, což znamená, že 10 g květů bylo přelito 100 ml vody a ponecháno 10 minut extrahovat při laboratorních podmínkách. Následně byl extrakt přeceděn přes sítko a poté přefiltrován přes Büchnerovu

nálevku za sníženého tlaku. Zakoncentrovaný extakt byl připraven na vakuové odparce podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.4

Vzorky byly odebírány z dolní komory Francovy cely pomocí dlouhé jehly, která byla prostrčena až doprostřed objemu komory. Odebírání proběhlo vždy celkem 4krát: po 30 minutách, po 1 hodině, po 2 hodinách a po 24 hodinách. Odebráno bylo asi 1 ml vzorku, který byl umístěn do nádoby Eppendorf a následně analyzován na HPLC. Objem roztoku odebraný z dolní komory byl doplněn čerstvým fyziologickým roztokem opět pomocí dlouhé jehly.

3.7 Analýza HPLC

K identifikaci a kvantitativnímu stanovení fenolických látek v extraktech byla využita metoda HPLC, přesněji kapalinový chromatograf Shimadzu LC-10A a k detekci byl použit připojený DAD detektor Shimadzu. Separace analytů probíhala na koloně Kinetex EVO C18, o rozměrech 250 x 4,6 mm, o velikosti částic sorbentu 5 μm . Všechny analýzy byly sledovány při vlnové délce 360 nm. Jako mobilní fáze byla využita směs methanol : voda : kyselina mravenčí a separace probíhala izokratickou elucí. Průtok eluentu byl nastaven na 0,5 ml/min, teplota na koloně byla 27 °C a velikost smyčky pro manuální dávkování vzorků byla 5 μl .

Pro přípravu mobilních fází byla použita voda čištěná pro HPLC, methanol a jako modifikátor kyselina mravenčí. Po smíchání všech složek v příslušných poměrech byla mobilní fáze odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut. Mobilních fází bylo vyzkoušeno několik, složení výchozí a výsledné je uvedeno níže.

1. MF : H₂O : CH₃OH : HCOOH v poměru 50 : 45 : 5
2. MF : H₂O : CH₃OH : HCOOH v poměru 62 : 33 : 5

Každý vzorek byl před nadávkováním přefiltrován přes 0,45 μm mikrofiltr a třikrát proměřen. Analýza trvala u všech měření 15–20 minut. Následně byly z chromatogramů odečítány plochy a výšky píků v retenčních časech odpovídajících sledovaným analytům.

Ve vzorcích byla zkoumána přítomnost a kvantita kyselin ferulové, chlorogenové a kávové. Proměřeny byly standardní roztoky jednotlivých kyselin a rutinu, následně směs kyselin v poměru 1:1:1. Dále byly analyzovány tyto reálné vzorky: extrakty z květů, extrakt z květů spolu se stonky, pouze ze stonků, zakoncentrovaného extraktu z květů a všech odběrů z Francových cel.

Standardní roztoky jednotlivých kyselin (viz kapitola 3.5) sloužily pro ověření retenčních časů a ke stanovení koncentrací 3 studovaných kyselin v extraktech. Kvantifikace byla počítána metodou nejbližšího vhodného standardu.

Analýza každého standardu i extraktu byla změřena vždy třikrát a z těchto hodnot byl vypočítán průměr.

3.8 Zpracování naměřených dat

Naměřená data byla zpracována programem Microsoft Excel. Z naměřených hodnot byl vypočítán průměr, použitím funkce PRŮMĚR. U fenolických kyselin byla z výsledků měření vypočtena směrodatná odchylka použitím funkce SMODCH, která byla pomocí funkce CONFIDENCE rozšířena pro interval spolehlivosti 95 %. Tato hodnota nejistoty měření byla s průměrnou hodnotou uvedena ve výsledcích.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Ověření optimálních podmínek pro přípravu extraktu z černého bezu

Tato diplomová práce navazuje na práci Ing. Sabiny Krůzové, která se tematikou extrakce bezových květů zabývala v předcházejícím roce.

První úsek experimentální části této diplomové práce zahrnuje ověření postupu pro přípravu extraktu z květů černého bezu. Optimalizovaným postupem byly dále připraveny extrakty z různých částí květenství bezu černého, aby bylo možno posoudit, jak ovlivňuje kvalitu extraktů různý poměr květů a stonků.

Kvalita všech připravovaných extraktů byla posuzována na základě spektrofotometrického stanovení obsahu celkových fenolických sloučenin Folin-Ciocalteuovým činidlem.

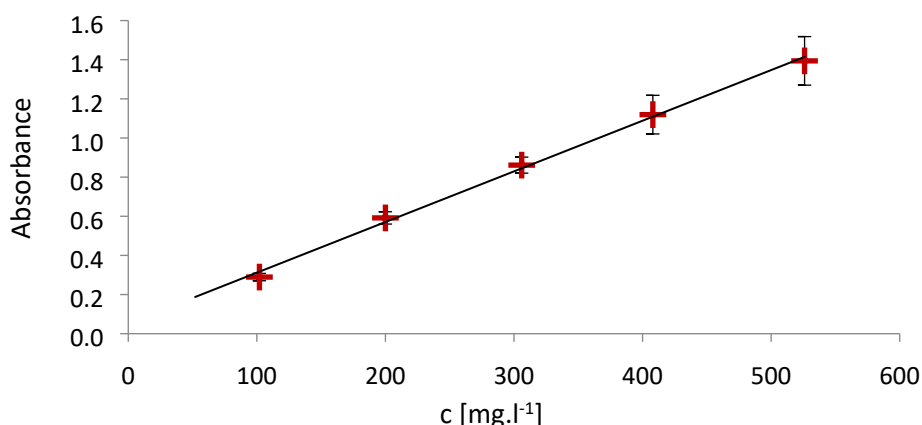
Jako extrakční činidlo byla použita výhradně voda, jakožto nejlevnější rozpouštědlo a zároveň i kvůli tomu, že výsledný extrakt má sloužit jako přídatek do koupele a voda je pro tento případ ideální.

4.1.1 Sestrojení kalibrační řady pro stanovení celkových polyfenolů

Pro kvantitativní stanovení obsahu polyfenolů v bezových extraktech Folin-Ciocalteuovým činidlem byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové, u které byl spektrofotometricky měřen obsah polyfenolů. Příprava kalibrace je uvedena v experimentální části v kapitole 3.4 a hodnoty průměrných absorbancí spolu s chybou jsou uvedeny v tabulce 3. Grafické znázornění závislosti absorbance na koncentraci s regresní rovnicí ukazuje obrázek 16.

Tabulka 3 Naměřená absorbance kalibrační řady v závislosti na koncentraci

Koncentrace kyseliny gallové [mg/l]	Průměrná absorbance	Chyba
102	0,289	± 0,019
200	0,592	± 0,031
306	0,861	± 0,041
408	1,119	± 0,099
526	1,394	± 0,124



Obrázek 16 Kalibrační řada kyseliny gallové – graf závislosti absorbance na koncentraci

Z obrázku 16 lze vidět, že závislost je v měřeném rozsahu lineární.

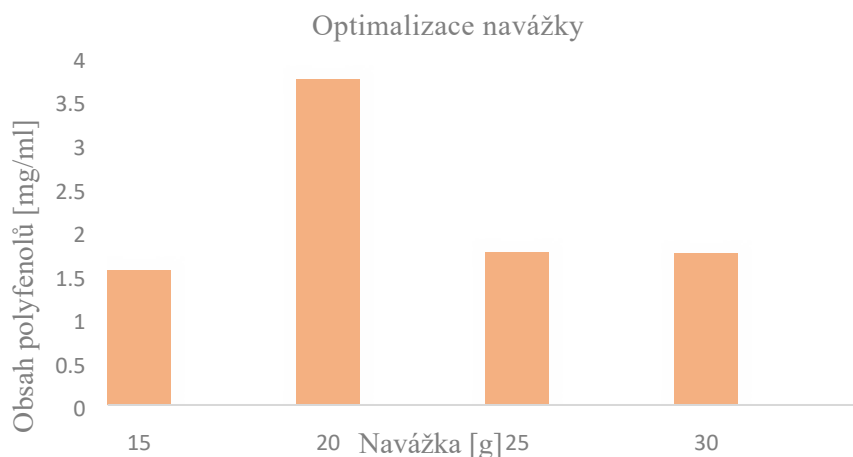
4.1.2 Ověření navážky sušených květů

Byly připraveny extrakty o navážce 15; 20; 25 a 30 g, které byly zality 200 ml vody. Přesný postup extrakce je uveden v kapitole 3.3.1. Extrakt byl od každé navážky připraven 3krát a 3krát v něm bylo stanoveno množství fenolických látek Folin - Ciocalteuovou metodou. Kvůli vysokým hodnotám absorbance bylo nutno každý vzorek 20krát ředit. Následně byl ze všech hodnot pro jednotlivé extrakty vytvořen průměr absorbance a vypočítán obsah polyfenolů v mg/ml spolu s chybou měření. Obsah polyfenolů byl vypočítán na základě kalibrační závislosti kyseliny gallové a vyjádřen jako ekvivalent této kyseliny.

Vypočítané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4 a grafické znázornění závislosti obsahu polyfenolů na navážce je uvedeno na obrázku 17.

Tabulka 4 Vypočtené hodnoty obsahu polyfenolů v extraktech o různé navážce květů

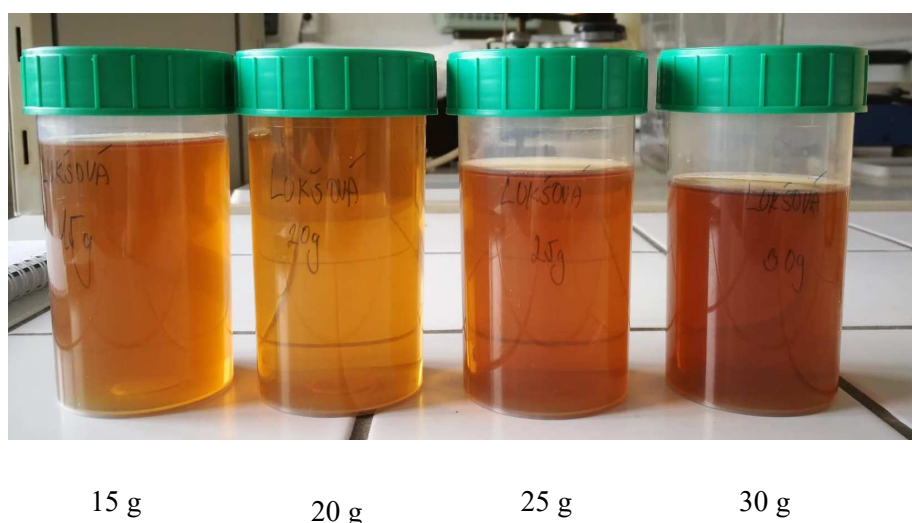
Optimalizace navážky			
Navážka [g]	Průměrná absorbance 20× zředěného vzorku	Obsah polyfenolů [mg/ml]	Chyba
15	0,254	1,546	± 0,035
20	0,538	3,733	± 0,057
25	0,281	1,754	± 0,014
30	0,278	1,733	± 0,033



Obrázek 17 Graf závislosti obsahu polyfenolů na navážce sušených květů

Nejvyšší podíl polyfenolů je obsažen v extraktu, který s 20 g sušených květů ve 200 ml vody. Nejmenší obsah polyfenolů má navážka 15 g ve 200 ml vody, což je logické, protože sušených květů je tu nejméně. Extrakt s navážkou 30 g sušených květů ve 200 ml extrakční vody, však neobsahuje nejvíce polyfenolů. Tento jev je pravděpodobně spojen s tím, že ačkoliv je květů nejvíce, tak vody je pro tohle množství málo a všechny květy nebyly dostatečně extrahované.

Co se týká barvy extraktů, tak se zvyšující se navážkou extrakt tmavne a jeho vůně se stává nepříjemnou. Extrakt s navážkou 20 g ve 200 ml je vzhledem, vůní i obsahem fenolických látek nejlepším extraktem v tomto ověření. Barevné rozdíly v extraktech lze vidět na obrázku 18.



Obrázek 18 Rozdíly v barvě u různých navážek ze sušených květů černého bezu

4.1.3 Ověření teploty vody

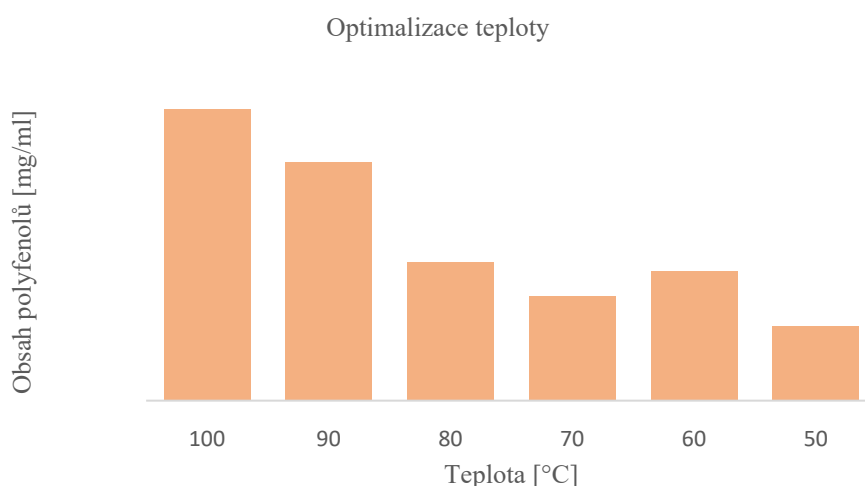
Byly vytvořeny extrakty o navážce 10 g, které byly zality 100 ml vody o rozdílné teplotě a to 50; 60; 70; 80; 90 a 100 °C. Přesný postup extrakce je uveden v kapitole 3.3.2.

Od každé teploty byly připraveny 3 extrakty a 3krát v nich bylo stanoveno množství fenolických látek Folin-Ciocalteuovou metodou. Kvůli vysokým hodnotám absorbance bylo nutno každý vzorek 20krát ředit. Následně byl ze všech hodnot pro jednotlivé extrakty vytvořen průměr absorbance a vypočítán obsah polyfenolů v mg/ml spolu s chybou měření. Obsah polyfenolů byl vypočítán na základě kalibrační závislosti kyseliny gallové a vyjádřen jako ekvivalent této kyseliny.

Vypočítané hodnoty jsou uvedeny spolu s chybou měření v tabulce 5 a grafická závislost obsahu polyfenolů na teplotě extrakční vody je znázorněna na obrázku 19.

Tabulka 5 Vypočtené hodnoty obsahu polyfenolů v extraktech při různých teplotách

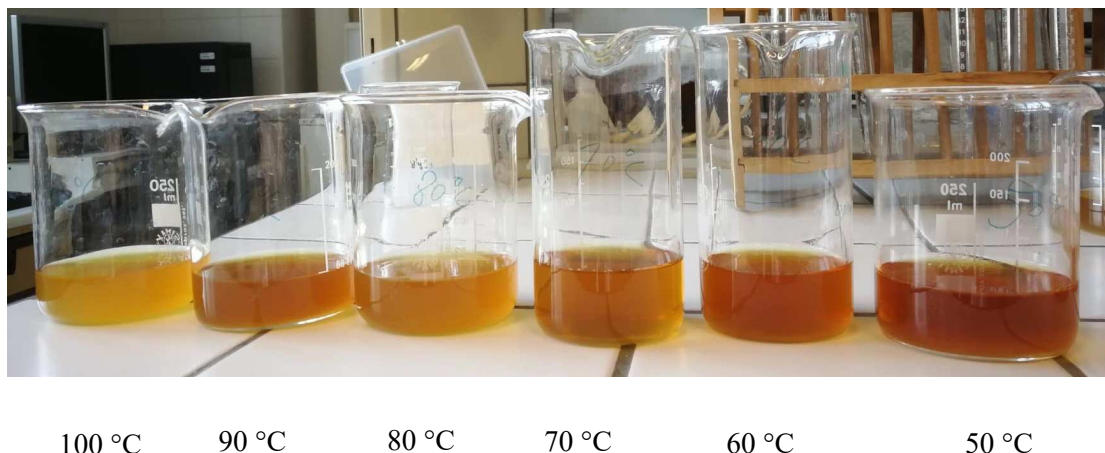
Optimalizace teploty			
Teplota [°C]	Průměrná absorbance 20 x zředěného vzorku	Obsah polyfenolů [mg/ml]	Chyba
50	0,169	0,891	± 0,033
60	0,254	1,547	± 0,078
70	0,215	1,249	± 0,015
80	0,268	1,656	± 0,028
90	0,424	2,856	± 0,058
100	0,506	3,487	± 0,014



Obrázek 19 Graf závislosti obsahu polyfenolů na teplotě extrakční vody

Nejvyšší obsah polyfenolů byl naměřen v extraktu extrahovaném vodou při teplotě 100 °C, nejnižší obsah polyfenolů byl zjištěn u teploty 50 °C. Obsah polyfenolů by se měl podle našich výsledků zvyšovat spolu se zvyšující se teplotou extrakčního rozpouštědla.

Jelikož byl každý vzorek nejprve ručně vymačkán a poté přefiltrován, tak je možné, že výchylka u vzorku extrahovaném při teplotě 60 °C byla způsobena mnohem větším vymačkáním květů, než bylo u ostatních vzorků. V obsahu polyfenolických kyselin hraje také velkou roli poměr květů a stonků.



Obrázek 20 Rozdíly v barvě podle různé teploty extrakčního rozpouštědla

Co se týká barvy, tak se zvyšující se teplotou barva extraktu světlá, což je vzhledově žádoucí. Ztráta barev je pravděpodobně způsobena rozkladem barviv při zvyšujících se teplotách, jelikož barviva nejsou termostabilní.

Nejlépe tedy vyšel vzorek extrahovaný při 100 °C. Tento extrakt měl největší obsah polyfenolických látek a vzhledově byl také nejlepší.

4.1.4 Extrakt z různých částí květenství

Tento experiment byl vytvořen, aby se zjistilo, jak moc důležité je složení směsi, z hlediska poměru květů a stonků, připravených na extrakci. K extrakci se berou celé květní lody, v nichž malé váhové procento tvoří samotné kvítky a podstatně větší váhové procento tvoří květní stopky. Odstraňování těchto stopek je časově náročné.

Byly připraveny extrakty o různém poměru kvítků černého bezu a stonků černého bezu. Tyto extrakty již byly připraveny optimalizovaným postupem podle kapitol 3.3.3 a 3.3.4. Celkem byly testovány 4 typy extraktů, od každého typu 3 vzorky, a ještě extrakt z květů vakuově zahuštěný. Pro stanovení obsahu polyfenolů v jednotlivých extraktech bylo nutno všechny vzorky ředit podle potřeby. Ředění je uvedeno v tabulce 6. Obsah polyfenolů v mg/ml včetně chyby měření byl vypočítán na základě kalibrační závislosti kyseliny gallové a vyjádřen jako ekvivalent této kyseliny.

Vypočítané hodnoty jsou uvedeny i s chybou měření v tabulce 6 a grafická závislost obsahu polyfenolů na typu extraktu je znázorněna na obrázku 21.

Tabulka 6 Vypočtené hodnoty obsahu polyfenolů v extraktech o různém poměru stonků a květů

Porovnání různých typů extraktů			
Typ extraktu	Průměrná absorbance 20 x zředěného vzorku	Obsah polyfenolů [mg/ml]	Chyba
Květy	0,488	3,344	± 0,017
Květy v čajovém sáčku	0,520	3,595	± 0,061
Květy spolu se stonky	0,353	2,308	± 0,040
10 x zředěný vzorek			
Stonky	0,315	1,008	± 0,011
30 x zředěný vzorek			
Zahuštěný extrakt z květů	0,909	3,820	± 0,016

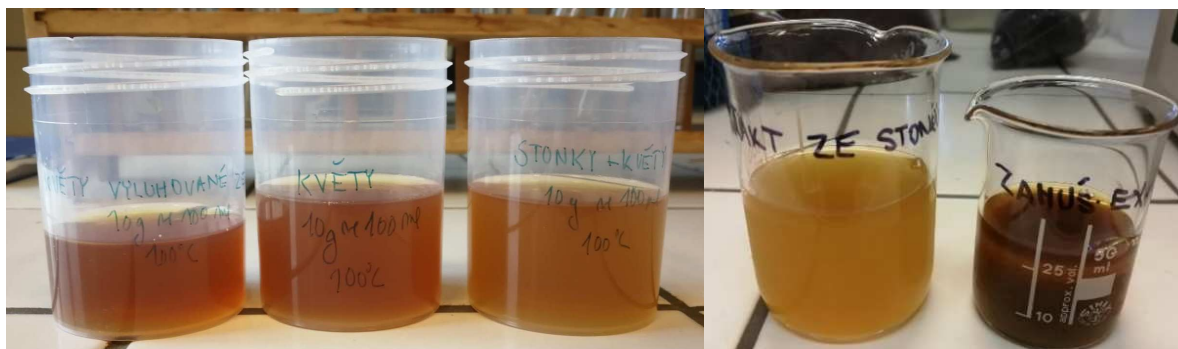
Porovnání extraktů o různém poměru stonků a květů



Obrázek 21 Grafická závislost obsahu polyfenolů na typu extraktu

Nejvíce fenolických látek bylo zjištěno v zahuštěném extraktu následované extraktem z květů a květů v čajovém sáčku, z čehož se potvrdilo, že květy obsahují nejvíce fenolických látek. Nejméně fenolických látek obsahuje naopak extrakt ze stonků. Srovnání extraktu květů a květů v gáze bylo jen zkušební, kvůli možnému zjednodušení extrakce ve velkém provozu. Oba dva roztoky byly však velmi dobře vymačkány a mají úplně stejné hodnoty. Z tohoto důvodu extrakt květů v gáze nebyl brán do dalších analýz a srovnání, jakožto zcela totožný s extraktem z květů.

Co se týká barvy a vůně extraktů, tak se zvyšujícím se množstvím stonků se extrakt stává světlejším, vzhledově nevyhovujícím a jeho vůně ztrácí intenzitu. Zahuštěný extrakt z květů výrazně ztmavnul a jeho barva také není ideální, ovšem na vůni to vliv nemá, jen je více intenzivní.



Květy v gáze

Květy

Stonky + květy

Stonky

Zahuštěný extrakt z květů

Obrázek 22 Rozdíly v barvě v extraktů s různým podílem stonků

4.2 Analýza HPLC

V extraktech černého bezu byly zkoumány fenolické kyseliny. Jmenovitě to byla kyselina chlorogenová, kávová a ferulová. Tyto fenolické látky byly vybrány na základě pozitivních výsledků diplomové práce Ing. Zuzany Škubalové. I když je z fenolických antioxidantů v černém bezu nejvíce zastoupen rutin, ten testován nebyl. Jeho prostupnost pokožkou je velmi nízká a extrakt by se měl využívat v lázeňství, kde je penetrace látek zásadní.

Nejprve bylo třeba upravit separační systém pro dělení uvedených 3 kyselin. Funkčnost optimalizovaného systému byla otestována na standardech těchto kyselin a na standardu rutinu. Posledně jmenovaná sloučenina sloužila pouze k identifikaci významného píku, který se objevoval prakticky ve všech extraktech.

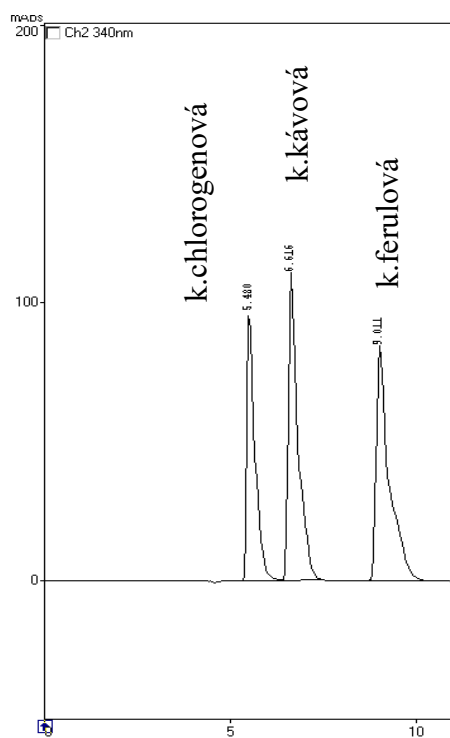
Dále byly zanalyzovány reálné roztoky: extrakt z květů, zahuštěný extrakt z květů, extrakt květů spolu se stonky a extrakt pouze ze stonků. Všechny extrakty byly připraveny za vypracovaných optimálních podmínek uvedených v kapitolách 3.3.3 a 3.3.4.

Ke kvantifikaci sledovaných fenolických kyselin byla použita metoda nejbližšího kalibračního standardu.

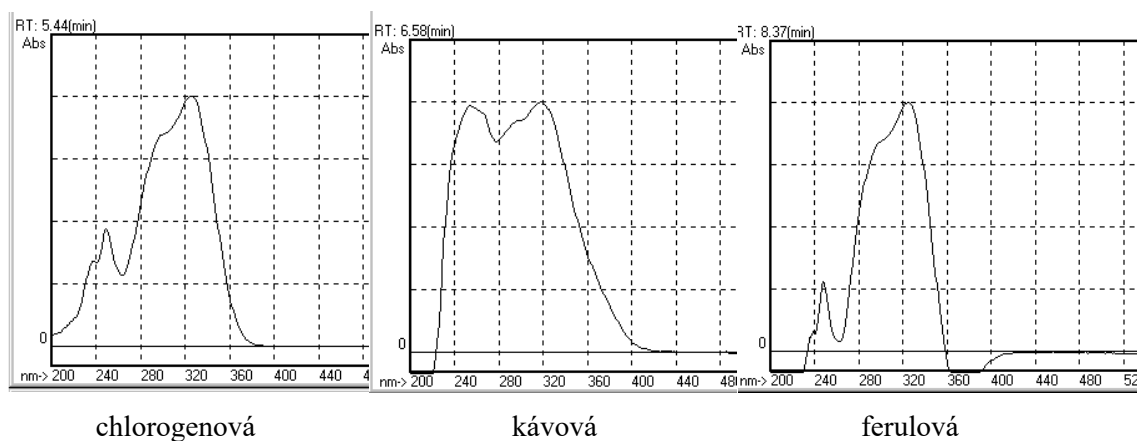
4.2.1 Úprava separačního systému

Jako výchozí mobilní fáze byla využita směs o složení 50 % deionizované vody, 45 % methanolu a 5 % kyseliny mravenčí. Tato fáze se neosvědčila, neboť nedošlo k dostatečnému oddělení píků.

Ve snaze o vylepšení se postupným přidáváním deionizované vody dosáhlo na výsledný poměr 62 % deionizované vody, 33 % methanolu a 5 % kyseliny mravenčí. Tento poměr rozpouštědel byl pro analýzu vyhovující, píky byly zřetelnější a byly od sebe dostatečně rozděleny, i když jejich tvar nebyl ideální. Chromatogram standardní směsi kyselin s finální mobilní fází lze vidět na obrázku 23.



Obrázek 23 Směsný standardní roztok kyselin separovaný finální mobilní fází



Obrázek 24 Spektra studovaných kyselin

4.2.2 Výpočet na nejbližší kalibrační standard

Z důvodu velkého rozptylu mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou koncentrace nebyla vytvořena kalibrační řada, ale kyseliny byly kvantifikovány na nejbližší kalibrační standard. Postup přípravy standardů je uveden v kapitole 3.5.

Tabulka 7 Výpočet na nejbližší kalibrační standard u kyseliny chlorogenové

Kyselina chlorogenová			
Koncentrace	Průměrná výška píku	Průměrná plocha píku	Průměrný retenční čas
[g/l]			[min]
0,005	1176885	22786064	5,3
0,002	4115	54758	5,4

Tabulka 8 Výpočet na nejbližší kalibrační standard u kyseliny kávové

Kyselina kávová			
Koncentrace	Průměrná výška píku	Průměrná plocha píku	Průměrný retenční čas
[g/l]			[min]
0,019	228937	17101670	6,4
0,002	5104	82456	6,6

Tabulka 9 Výpočet na nejbližší kalibrační standard u kyseliny ferulové

Kyselina ferulová			
Koncentrace	Průměrná výška píku	Průměrná plocha píku	Průměrný retenční čas
[g/l]			[min]
0,012	450659	9663201	8,5
0,002	3343	79239	8,4

4.2.3 Analýza připravených extraktů

Byly proměřeny všechny připravené extrakty, tj. extrakty z květů, z květů se stonky, pouze ze stonků a zahuštěný extrakt z květů. Extrakty byly připraveny dle optimalizovaného potupu, viz kapitoly 3.3.3 a 3.3.4. U zahuštěného extraktu z květů následně proběhlo zahuštění na vakuové odparce.

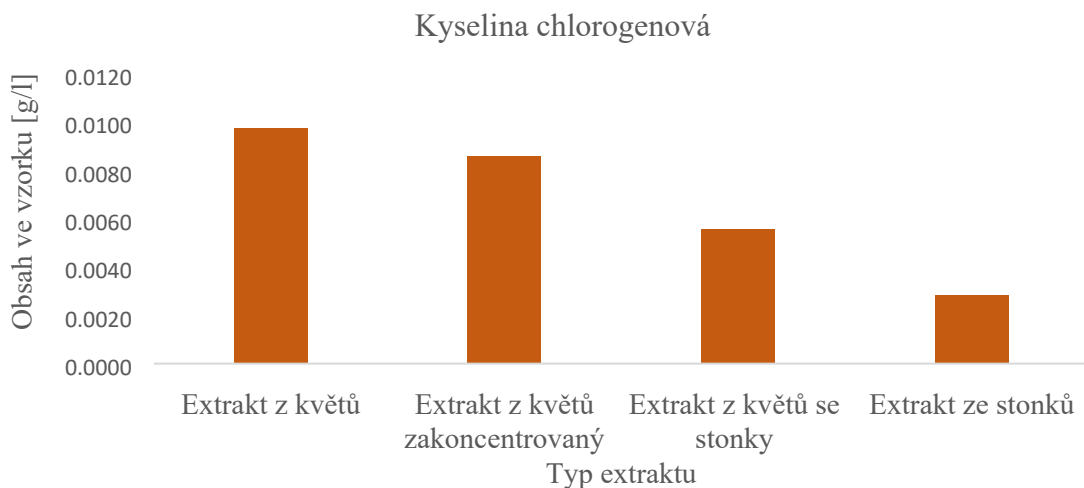
Každý vzorek byl proměřen třikrát a z hodnot byl vypočítán průměr. Z naměřených kalibračních standardů byla vybrána koncentrace podobnější vzorku a pomocí úměrnosti byl vypočítán obsah fenolických kyselin. Na výpočet byla používána výška píku.

Chromatogramy jednotlivých extraktů lze vidět v příloze 2, 3, 4 a 5.

Tabulka 10 Vypočítané obsahy fenolických kyselin v různých typech extraktu

Typ extraktu	Kyselina	Průměrná výška píku	Retenční čas [min]	Průměrná plocha píku	Obsah ve vzorku [g/l]
Extrakt z květů	chlorogenová	1152134	4,7	21729430	0,0098
	kávová	49489	6,3	844497	0,0008
	ferulová	75428	8,3	1791553	0,0041
Extrakt z květů zakoncentrovaný	chlorogenová	1752579	5,3	46477638	0,0086
	kávová	33538	6,4	2230938	0,0003
	ferulová	213699	8,2	6672887	0,0068
Extrakt z květů se stonky	chlorogenová	657878	5,4	20364926	0,0056
	kávová	16682	6,5	946212	0,0003
	ferulová	42839	8,8	1022489	0,0023
Extrakt ze stonků	chlorogenová	332823	5,5	6731603	0,0028
	kávová	6303	6,5	92053	0,0001
	ferulová	3145	8,8		0,0002

Píky byly identifikovány podle retenčních časů a jejich shody se standardy. Identifikace malých nebo špatně rozlišených píků byla potvrzena obohacením vzorků standardem (tzv. spikování), což lze vidět v příloze 6 a 7.



Obrázek 25 Grafické znázornění kyseliny chlorogenové ve vzorcích

Kyselina chlorogenová je nejvíce zastoupená v extraktu z květů, nejméně naopak v extraktu ze stonků. Celkově je kyselina chlorogenová ve všech extraktech obsažená v největším množství, jelikož květy obsahují této kyseliny nejvíce. Zahuštěný extrakt z květů pravděpodobně část kyseliny chlorogenové ztratil, když byla během odpařování na odparce vystavena teplu.



Obrázek 26 Grafické znázornění obsahu kyseliny kávové ve vzorcích

Kyselina kávová se nejvíce nachází v extraktu z květů a nejméně opět v extraktu ze stonků. Zahuštěný extrakt z květů pravděpodobně část kyseliny kávové ztratil během odpařování na odparce.



Obrázek 27 Grafické znázornění obsahu kyseliny ferulové ve vzorcích

Nejvíce kyseliny ferulové obsahuje zahuštěný extrakt z květů a nejméně extrakt ze stonků. Rozdíly obsahu kyseliny ferulové mezi extraktem z květů a zahuštěným extraktem nejsou až tak velké. Z výsledků je zřejmé, že oproti kyselině chlorogenové a kávové, nepodléhá tak velkému rozkladu při vysoké teplotě, již byla vystavená během odpařování na odparce.

Při celkovém vyhodnocení analýz všech 4 připravených extraktů tedy vychází, že kyselina chlorogenová i kávová je nejvíce obsažená v extraktu z květů. Kyselina ferulová je nevíce obsažená v zahuštěném extraktu. Takže z výsledku je patrné, že kyselina chlorogenová i kávová podléhají tepelnému rozkladu a oxidaci snáze než kyselina ferulová. Nejméně všech tří hledaných kyselin obsahuje extrakt ze stonků. A z výsledků lze také vidět, že se zvyšujícím se množstvím stonků v extrakční směsi klesá hodnota všech fenolických látek.

4.3 Difuzní cely

Studium transdermální absorpce extraktů bezových květů zahrnovalo přípravu kožních membrán, sestavení aparatury difuzních Franzových cel a dále identifikaci a kvantifikaci 3 studovaných fenolických kyselin odebraných z akceptorové tekutiny ze spodní části Franzovy cely.

Po celou dobu práce byl dodržován postup popsáný v kapitole 3.6. Bylo odebíráno jen tolik vzorku, aby neklesla hladina akceptorové kapaliny pod úroveň vnitřního dávkovacího otvoru. To by způsobilo vznik bublin a následně změnilo prostup zkoumaných látek.

Na transdermální absorpci byly použity: extrakt z květů a zahuštěný extrakt z květů připravený optimalizovanou extrakcí dle kapitol 3.3.3. a 3.3.4, a standardní směs fenolických kyselin chlorogenové, kávové a ferulové v poměru 1:1:1.

Každý extrakt i standardní směs kyselin byla na Franzovu celu aplikována třikrát. Vzorky byly odebírány ze spodní části Franzovy cely do nádobek Eppendorf (viz postup v kapitole 3.6.4). Každý z odebraných vzorků byl 3x dávkován do chromatografu.

4.3.1 Příprava kožní membrány

Velmi důležitou součástí při studiu transdermální absorpce je samotná příprava kožní membrány. Na základě literární rešerše byla jako model lidské kůže použita prasečí kůže z ušního boltce. Uši byly čerstvé, nejvýše 2 dny od porážky, Čerstvost do dvou dnů by měla zajistit částečné zachování enzymatického systému kůže.

Zpracování kůže bylo realizováno ručně pomocí chirurgického skalpelu. Seřezávání bylo započato u špičky ucha a následně byla seříznuta celá část dané strany, aby byla odstraněna celá tuková vrstva a nechán pouze epidermis a dermis. Tento postup se opakoval i z druhé strany ušního boltce.

Bylo snahou získat vždy stejnou tloušťku membrány, avšak ručně toho bylo těžké dosáhnout. Vždy se lišila tloušťka podkožního tuku a tím i jeho množství, které se nepodařilo odstranit a zůstávalo na membránách použitých při pokusech. Tloušťka membrány byla vždy zkontrolována ručním mikrometrem, ale nedařilo se připravit dvě membrány o stejné tloušťce.

Ačkoliv bylo ucho vždy seříznuto co nejpečlivěji, tak některé uši byly více či méně prokrvené a na membránách zůstaly žilky. Ty mohly být pravděpodobnou příčinou zkreslení u některých analýz HPLC.

4.3.2 Závislost množství absorbované látky na čase působení

Prostupnost fenolických látek z extraktů přes membránu byla zkoumána v závislosti na čase působení. Kvantifikace prošlých látek byla spočítána na základě výpočtu na nejbližší kalibrační standard u jednotlivých zkoumaných fenolických kyselin. Přesný postup odebrání vzorků je uveden v kapitole 3.6.4.

Experimentu byl podroben extrakt z květů, zahuštěný extrakt z květů a směsný standardní roztok kyselin chlorogenové, kávové a ferulové v poměru 1:1:1.

Vzorky ze spodní komory Franzovy cely byly odebrány celkem 4; a to po půl hodině, po hodině, po dvou hodinách a po 24 hodinách. Po delším, než 24hodinovém působení vodného roztoku na kožní membránu dochází k její nadměrné hydrataci a k narušení její integrity. Proto bylo 24 hodin zvoleno jako maximální časová hranice. Nejpodstatnější čas je 30 minut, jelikož extrakt z bezových květů je zamýšlen jako součást lázeňské koupele, která trvá přibližně 20-30 minut.

Všechny experimenty byly provedeny třikrát a každý vzorek byl třikrát proměřen. Ze vzorků byl vypočítán průměr. Některé experimenty nebyly zahrnuty do průměru, jelikož došlo ke zkreslení již od prvního odběru.

4.3.2.1 Prostupnost směsného standardního roztoku kyseliny chlorogenové, kávové a ferulové přes membránu

Při měření prostupnosti směsného roztoku kyselin prošla vždy pouze kyselina kávová. Její množství ve fyziologickém roztoku s časem roste. Kyselina chlorogenová a ferulová nebyly vůbec detekovány pomocí HPLC.

Tabulka 11 Vypočtené hodnoty prostupnosti fenolických látek přes kožní membránu u směsného roztoku kyselin

Směs kyselin					
Odběr	Typ kyseliny	Průměrný retenční čas	Průměrná výška píku	Obsah ve fyziologickém roztoku	Propustnost
				[mg/l]	[%]
30 minut	kávová	6,7	482	4,0E-06	0,57
1 hodina		7,2	638	5,3E-06	0,76
2 hodiny		7,0	662	5,5E-06	0,79
24 hodin		6,8	748	6,2E-06	0,89

Z důvodu neprostupnosti 2 kyselin přes kožní membránu byl proveden experiment na syntetických membránách o velikosti pórů 0,23 μm a 0,40 μm .

Tabulka 12 Vypočtené hodnoty prostupnosti fenolických kyselin přes syntetickou membránu o velikosti pórů 0,40 μm

Směs fenolických kyselin přes membránu o velikosti pórů 0,40 μm po 30 min			
Typ kyseliny	Průměrný retenční čas	Průměrná výška píku	Absorbce [%]
chlorogenová	5,2	3654	4,9
kávová	6,2	5170	6,1
ferulová	8,1	4255	6,7

Přes membránu o velikosti 0,40 μm prostupovaly všechny tři fenolické kyseliny, nejvíce kyselina ferulová, následovaná kyselinou kávovou a chlorogenovou.

Tabulka 13 Vypočtené hodnoty prostupnosti fenolických kyselin přes syntetickou membránu o velikosti pórů 0,23 μm

Směs fenolických kyselin přes membránu o velikosti pórů 0,23 μm po 30 min			
Typ kyseliny	Průměrný retenční čas	Průměrná výška píku	Absorpce [%]
chlorogenová	5,3	1187	1,6
kávová	6,3	616	0,7
ferulová	8,6	376	0,6

U syntetické membrány o velikosti 0,23 μm prostupovaly také všechny kyseliny, ale už výrazně v menším množství, než tomu bylo u předcházející membrány. Nejvíce prostupovala opět kyselina ferulová, následována kyselinou kávovou a chlorogenovou.

Chromatogramy směsného standardu kyselin prostupujícího syntetickými membránami jsou uvedeny v příloze 8 a 9.

Fenolické kyseliny přes syntetické membrány procházely, což prokázalo, že chyba není v samotném směsném roztoku, ale pravděpodobně v přípravě kožní membrány nebo chybou v postupu.

4.3.2.2 Prostupnost extraktu z květů přes kožní membránu

Transdermální absorpci byl podroben extrakt z květů připravený optimálním extrakčním postupem. Procentuální množství propuštěných fenolických kyselin lze vidět v tabulkách 14, 15 a 16. Chromatogramy květových extraktů prošlých kožní membránou do fyziologického roztoku po půl hodině lze vidět v příloze 10 a po dvou hodinách v příloze 11.

Tabulka 14 Propustnost kyseliny chlorogenové přes kožní membránu

Reálná vzorek					
Odběr	Typ kyseliny	Průměrný retenční čas	Průměrná výška píku	Obsah ve fyziologickém roztoku	Propustnost [%]
				[mg/l]	[%]
30 minut	chlorogenová	5,9	5941	2,5E-05	0,26
1 hodina		5,9	8654	3,7E-05	0,37
2 hodiny		5,9	12494	5,3E-05	0,54
24 hodin		5,9	542	2,3E-06	0,02

Extrakt z květů černého bezu obsahuje kyseliny chlorogenové nejvíce, avšak propustnost přes kožní membránu tu byla po 30 minutách nejmenší. S časem se zvětšovalo její množství ve fyziologickém roztoku. Po 24 hodinách nastal výrazný pokles, což je pravděpodobně způsobeno vyloučenou krví z žilek prasečího ucha a následným zkreslením analýzy.

Tabulka 15 Propustnost kyseliny kávové přes kožní membránu

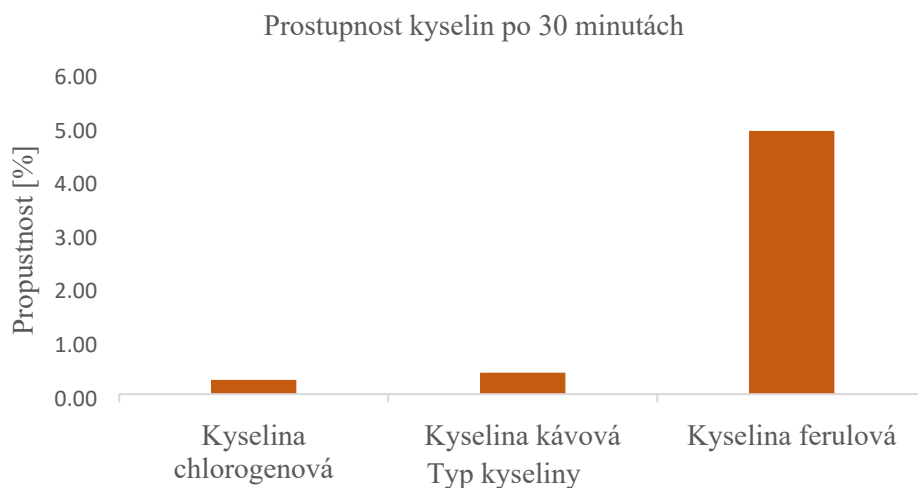
Reálná vzorek					
Odběr	Typ kyseliny	Průměrný retenční čas	Průměrná výška píku	Obsah ve fyziologickém roztoku	Propustnost [%]
30 minut	kávová	7,3	377	3,1E-06	0,39
1 hodina		7,5	385	3,2E-06	0,40
2 hodiny		7,4	390	3,2E-06	0,40
24 hodin		0,0	0	0,0E+00	0,00

Kyselina kávová přes kožní membránu procházela, ale s časem se její množství příliš neměnilo. Po 24 hodinách nebyly detekované žádné fenolické kyseliny, pravděpodobně z důvodu zkreslení analýzy způsobeném vyloučenou krví ze žilek vepřového ucha.

Tabulka 16 Propustnost kyseliny ferulové přes kožní membránu

Reálná vzorek					
Odběr	Typ kyseliny	Průměrný retenční čas	Průměrná výška píku	Obsah ve fyziologickém roztoku	Propustnost [%]
30 minut	ferulová	11,2	7365	2,0E-04	4,90
1 hodina		11,2	7519	2,1E-04	5,01
2 hodiny		11,2	7526	2,1E-04	5,01
24 hodin		0,0	0	0,0E+00	0,00

Kyselina ferulová je v extraktu z květů černého bezu druhá nejvíce rozšířená a její schopnost prostupovat kožní membránou je ze všech kyselin nejlepší. S časem se její prostoupené množství měnilo minimálně a po 24 hodinách nebylo detekováno nic stejně jako u předešlých případů.



Obrázek 28 Grafické znázornění fenolických kyselin ve fyziologickém roztoku po 30 minutách v extraktu z květů

Extrakt z květů černého bezu by měl být primárně určen na koupele, kde každá trvá 20-30 minut. Z tohoto důvodu je nejdůležitější propustnost po 30 minutách. U všech kyselin propustnost po 30 minutách byla detekována. Největší u kyseliny ferulové, nejmenší u kyseliny chlorogenové, která je paradoxně v extraktu obsažena nejvíce. V závislosti na čase se propustnost méně či více zvětšovala, v žádném případě se nezmenšovala. Pouze po 24 hodinách nebylo detekováno převážně nic z důvodu zkreslení analýzy.

4.3.2.3 Prostupnost zahuštěného extraktu z květů přes membránu

Transdermální absorpci byl podroben extrakt z květů vytvořených za zjištěných optimálních podmínek, což znamená 10 g květů extrahovaných ve 100 ml vody o teplotě 100 °C po dobu 10 minut. Následně byl přeceděn přes sítko a poté přefiltrován přes Büchnerovu nálevku za sníženého tlaku. Tento extrakt byl následně zahuštěn na vakuové odparce, přesný postup je uveden v kapitole 3.3.4. Procentuální množství propuštěných fenolických kyselin lze vidět v tabulkách 17; 18 a 19.

Tento experiment byl proveden kvůli zjištění, jak moc velký vliv má vyšší koncentrace extraktu na propustnost přes kožní membránu. Chromatogram zahuštěného extraktu z květů prošlého kožní membránou do fyziologického roztoku po půl hodině lze vidět v příloze 12.

Tabulka 17 Vypočítané hodnoty prostupu kyseliny chlorogenové přes kožní membránu

Reálný vzorek odstředěný					
Odběr	Typ kyseliny	Průměrný retenční čas	Průměrná výška píku	Obsah ve fyziologickém roztoku [mg/l]	Propustnost [%]
30 minut	chlorogenová	6,5	273	1,2E-06	0,005
1 hodina		6,5	2580	1,1E-05	0,050
2 hodiny		5,8	3514	1,5E-05	0,068
24 hodin		5,7	564	2,4E-06	0,011

Kyselina chlorogenová byla ve fyziologickém roztoku detekována, ale ve velmi malém množství. S časem se propustnost zvětšovala. Po 24 hodinách došlo k výraznému poklesu, který byl pravděpodobně způsoben vyloučenou krví z žilek prasečího ucha a následným zkreslením analýzy.

Tabulka 18 Vypočítané hodnoty prostupu kyseliny kávové přes kožní membránu

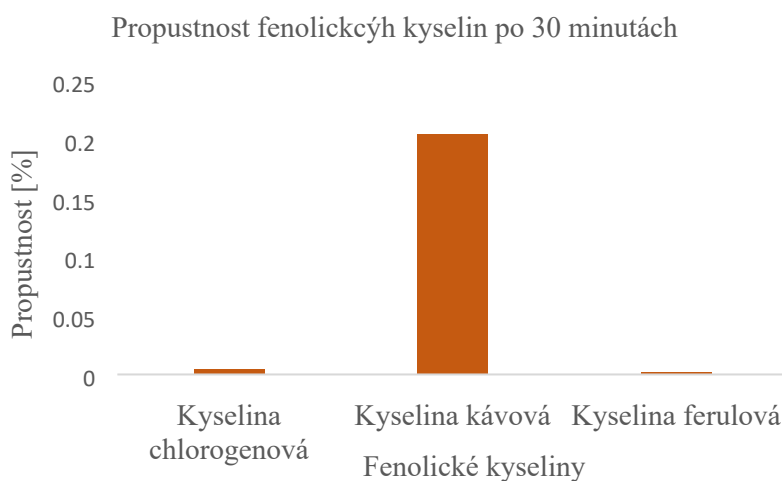
Reálný vzorek odstředěný					
Odběr	Typ kyseliny	Průměrný retenční čas	Průměrná výška píku	Obsah ve fyziologickém roztoku	Propustnost [%]
30 minut	káвовá	7,3	198	1,6E-06	0,205
1 hodina		7,5	237	2,0E-06	0,246
2 hodiny		7,1	298	2,5E-06	0,309
24 hodin		0,0	0	0,0E+00	0,000

Propustnost kyseliny kávové přes kožní membránu byla ze všech kyselin u tohoto extraktu nejlepší. S časem se zvětšovala, i přesto, že zakonzentrovaný extrakt z květů obsahuje nejméně právě kyseliny kávové. Po 24 hodinách opět nebylo detekováno nic z důvodu zkreslení analýzy.

Tabulka 19 Vypočítané hodnoty prostupu kyseliny ferulové přes kožní membránu

Reálný vzorek odstředěný					
Odběr	Typ kyseliny	Průměrný retenční čas	Průměrná výška píku	Obsah ve fyziologickém roztoku	Propustnost [%]
30 minut	ferulová	11,1	111	3,0E-07	0,002
1 hodina		11,2	156	4,3E-07	0,002
2 hodiny		11,2	172	4,7E-07	0,003
24 hodin		0,0	0	0,0E+00	0,000

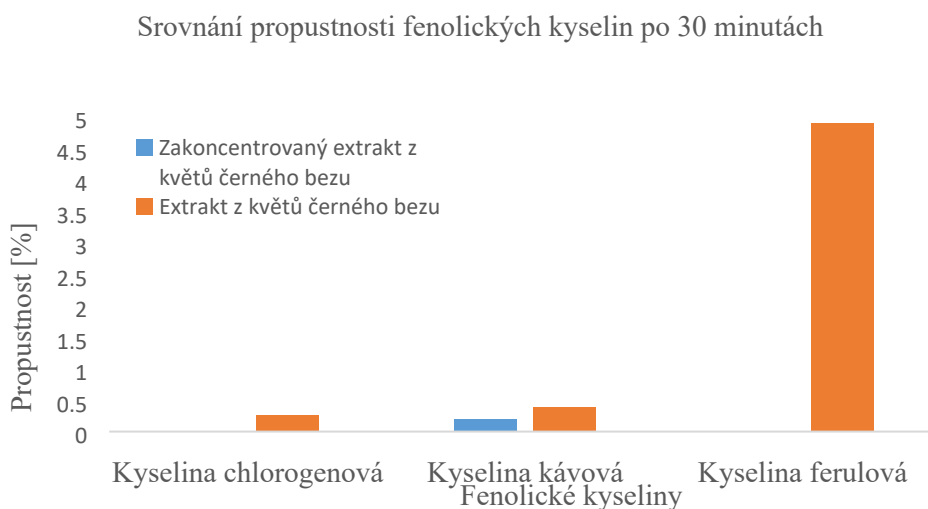
Kyselina ferulová byla také ve fyziologickém roztoku detekována, ale pouze ve velmi malém množství, které se s časem příliš neměnilo. Po 24 hodinách opět nebyly detekovány žádné fenolické kyseliny z důvodu zkreslení analýzy.



Obrázek 29 Grafické znázornění fenolických kyselin ve fyziologickém roztoku po 30 minutách v zakoncentrovaném extraktu z květů

Jelikož extrakt by měl být primárně určen na koupele, kde každá trvá 20-30 minut, je nejdůležitější propustnost po 30 minutách. U všech fenolických kyselin propustnost detekována byla, ale ve velmi malém až nepatrném množství. Kyselina kávová výrazně vyčnívala, což je patrné na grafickém znázornění na obrázku 32. Následovaly kyselina chlorogenová a kávová.

Zakoncentrovaný extrakt sloužil především pro zjištění, jestli koncentrace extraktu ovlivňuje propustnost přes kožní membránu. Bylo zjištěno, že příliš velká koncentrace extraktu pravděpodobně tuto membránu ucpává. Také je možné, že fenolické kyseliny se přichytávají na ochlupení, a tím pádem se zmenšuje množství fenolických kyselin, které by mohly procházet do fyziologického roztoku. Nejpravděpodobnější je kombinace obou možných chyb. V každém případě, se zvyšující koncentrací se propustnost zhoršuje, jak je vidět na obrázku 33.



Obrázek 30 Grafické znázornění propustnosti fenolických kyselin u extraktu z květů a zahuštěného extraktu z květů po 30 minutách

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit extrakt z květů černého bezu, který si ponechá co nejvíce biologicky aktivních látek a jež může být použit do lázeňských koupelí. Bylo nutno najít způsob, jak připravený extrakt co nejlépe a levně uchovat. V neposlední řadě se diplomová práce zabývala prostupem zvolených fenolických kyselin pokožkou metodou transdermální absorpce.

V teoretické části práce je popsáno taxonomické zařazení bezu černého, jeho stručná botanická charakteristika a jeho využití. Pozornost je věnována také účinným látkám, v něm obsaženým, především fenolickým kyselinám, které mají blahodárné účinky na pokožku. Detailně je zde také popsána anatomie kůže a problematika prostupu fenolických kyselin pokožkou. V závěru této části zařazena kapitola věnovaná popisu vysokoúčinné kapalinové chromatografie, jakožto přístroji, který sloužil ke většině instrumentálních analýz.

V experimentální části bylo nejprve třeba ověřit optimální podmínky přípravy extraktu z květů černého bezu, při kterých se zachová co nejvíce fenolických kyselin. Celkové fenolické kyseliny byly stanovovány spektrofotometricky pomocí Folin - Ciocalteuova činidla. Z experimentů vplynuly jako nejlepší tyto podmínky extrakce:

Teplota extrakčního rozpouštědla (voda): 100 °C

Poměr navážky: objemu extrakčního rozpouštědla (voda): 1:10 (m/V)

Extrakční doba: 10 minut

Následně bylo zkoumáno, jak velký vliv na kvalitu připravovaného extraktu má podíl stopek z květní laty. Za výše uvedených optimálních podmínek byly připraveny extrakty, ve kterých byl různý poměr kvítků a stopek. Podle předpokladů bylo zjištěno, že nejvíce fenolických kyselin obsahuje extrakt pouze z kvítků, 3,35 mg kyselin v 1 ml. Extrakt připravený jenom ze stopek květních lat obsahoval fenolických kyselin nejméně, a to 1 mg·ml⁻¹. Extrakt připravený z květů se stopkami tak, jak byly natrhány a usušeny, aniž byly aspoň části stopek odstraněny, obsahovala 2,3 mg/ml fenolických kyselin. To značí, že přítomnost neodstraněných stopek má velký vliv na snížení obsahu fenolických kyselin v extraktu. Mělo by se tedy v provozu dbát na to, aby se co nejvíce snížil jejich obsah ve finální směsi použité k extrakci.

V připravených extraktech byly následně stanoveny již konkrétní fenolické látky, jmenovitě kyselina chlorogenová, kávová a ferulová. K analýzám byla použita kapalinová chromatografie.

Přesto, že extrakt z černého bezu obsahuje nejvíce rutinu, tak rutin v této práci sledován nebyl. Důvodem je jeho špatná rozpustnost ve vodě a nízká propustnost přes pokožku.

Z extraktu s nejvyššími hodnotami fenolických kyselin, což je extrakt z květů, byla připravena zahuštěná verze, jako varianta pro lepší skladování. Výsledná barva zahuštěného extraktu je však výrazně horší oproti nezahuštěnému extraktu z květů.

Extrakt z květů obsahuje nejvíce kyseliny chlorogenové - 0,0098 mg·ml⁻¹ následuje kyselina ferulová s hodnotou 0,0041 mg/ml a nejméně obsahuje kyseliny kávové s hodnotou 0,0008 mg/ml. Zahuštěný extrakt obsahuje tato množství sledovaných kyselin:

- kyseliny chlorogenové 0,0086 mg·ml⁻¹
- kyseliny ferulové 0,0068 mg·ml⁻¹
- kyseliny kávové 0,0003 mg·ml⁻¹

Z výsledků lze poznat, že zahuštěný extrakt část kyseliny chlorogenové a kávové ztratil pravděpodobně v procesu odpařování na vakuové odparce, kde byl extrakt vystaven teplu. Kyselina ferulová ovlivněna nebyla.

Dále se experimentální část zabývala prostupností vybraných fenolických kyselin pokožkou. Byly k tomu využity Franzovy difúzní cely. Jako membrána byla vybrána vepřová kůže z ušního boltce, která byla nepoškozená, netetovaná, čerstvá a tepelně neošetřená. Prasečí uši nebyly odchlupeny, aby byla co nejvěrněji napodobena lidská pokožka, na které se ochlupení také nachází. Pro tyto experimenty byl využit extrakt z květů a zahuštěný extrakt z květů. Vzorky byly odebírány po půl hodině, hodině, dvou hodinách a 24 hodinách. Ačkoliv byla kožní membrána vždy seříznuta co nejpečlivěji, přesto byla více či méně prokrvená a na membránách zůstaly žilky. Žilky byly pravděpodobnou příčinou zkreslení u analýzy HPLC, kdy z odběru po 24 hodinách kapalinový chromatograf nedetekoval žádné fenolické látky.

Celkově mnohem lepší prostupnost fenolických kyselin byla u extraktu z květů. Největší procentuální propustnost přes kožní membránu, vzhledem k celkovému množství v extraktu, měla kyselina ferulová, a to 4,90 %. U kyseliny kávové to bylo 0,39 % a kyseliny chlorogenové 0,26 %. Zahuštěný extrakt z květů měl největší prostupnost kyseliny kávové s hodnotou 0,205 %, následované kyselinou chlorogenovou - 0,005 % a nejmenší prostupnost byla nalezena u kyseliny ferulové - 0,002 %.

Zahuštěný extrakt měl tak malou propustnost přes kožní membránu, pravděpodobně díky své vysoké koncentraci, kdy se část fenolických kyselin mohla usadit na chlupech nebo ucpat kožní membránu. Nejvíce pravděpodobná je kombinace obou těchto problémů. Co se týče odběru po hodině a dvou hodinách, u obou dvou extraktů se hodnoty propustnosti zvětšovaly.

Závěrem lze shrnout:

- optimální podmínky tvorby extraktu byly vypracovány (1 :10 ($m_{\text{květů}}/V_{\text{voda}}$, 100 °C, 10 minut)
- bylo zjištěno, že stopky výrazně snižují obsah fenolických kyselin v extraktu
- byla připravena zahuštěná verze extraktu z květů, která je vhodnější z hlediska objemu na skladování
- propustnost sledovaných kyselin přes pokožku byla nízká, ale vzrůstající s časem
- příliš vysoká koncentrace extraktu propustnosti škodí.

Pokud by se pokračovalo v této práci, bylo by vhodné se zaměřit pouze na transdermální absorpci pomocí difúzních cel, optimalizovat metodu a prověřit další možnosti stabilizování extraktu.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] OPICHAL, František a Drahoslav DOSTÁL. Bez černý- Sambucus nigra L.-Baza černá chutná potravina a ještě lepší lék. 4. vyd. Olomouc: D. Dostál, 1991.
- [2] Hanspeter, Hemgesberg: Černý bez a naše zdraví. Fontána, 2002. 160 s. ISBN 80-86179-98-2.
- [3] Bez černý - Sambucus nigra [online]. 2007 [cit. 2018-03-16]. ISSN 1801-2787. Dostupné z: <https://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=816>
- [4] LUKŠOVÁ, L. *Chemická charakteristika plodů slivoně mirabelky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 64 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D..
- [5] Sambucus nigra (elder). In: CABI [online]. Wallingford: Invasive Species Compendium, 2018, 03 January 2018 [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/48259>
- [6] JANEČEK, Vladimír a Jana EŠNEROVÁ. Bez černý (Sambucus nigra) a bez červený (Sambucus racemosa). Lesnická práce. (Czechoslovak Republic. Ministerstvo lesů a dřevařského průmyslu) Praha. 2012, roč. 91, 10/12. Dostupné z: <http://www.lesprace.cz/casopis-lesnicka-prace-archiv/rocnik-91-2012/lesnicka-prace-c-10-12/bez-cerny-sambucus-nigra-a-bez-cervený-sambucus-racemosa>
- [7] LIM, Tong Kwee. Edible medicinal and non-medicinal plants. New York: Springer, 2012, v. . ISBN 978-90-481-8660-0.
- [8] TOMKO, Josef a kol. *Farmakognózia: učebnica pre farmaceutické fakulty*. 2., opr. vyd. Martin: Osveta, 1999. ISBN 80-806-3014-3.
- [9] BULÁNKOVÁ, Iveta. *Léčivé rostliny na naší zahradě*. 2005. Praha: Grada, 2005. Česká zahrada. ISBN 80-247-1274-1.
- [10] BERHOW, Mark a Steven VAUGHN. Higher Plant Flavonoids: Biosynthesis and Chemical Ecology. Principles and Practises of Plant Ekology. USA: CrC Press., 1999, s. 423- 438.
- [11] JIRÁSEK, Václav a František STARÝ. Atlas Léčivých rostlin. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. ISBN 14-578-86.
- [12] GRAU, Jürke, Reinhard JUNG a Bertram MÜNKER. Bobulovité, užitkové a léčivé rostliny. Praha: Knižní klub, 1996, 287 s. ISBN 80-720-2023-4.

- [13] SIDOR, Andrzej a Anna GRAMZA-MICHAŁOWSKA. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *Journal of Functional Foods*. 2014. DOI: 10.1016/j.jff.2014.07.012.
- [14] NILE, Shivraj Hariram a Se Won PARK. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*. 2014, vol. 30, issue 2, s. 134-144. DOI: 10.1016/j.nut.2013.04.007.
- [15] JORDÁN, Václav a Marie HEMZALOVÁ. *Antioxidanty: zázračné zbraně : vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. Brno: Jota, 2001. Jak na to (Jota). ISBN 80-721-7156-9.
- [16] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 978-808-6659-176.
- [17] HUBÍK, Josef et al. *Obecná farmakognosie II. 3. přeprac.* Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989, 297 s.
- [18] UNGER-GÖBEL, Ulla. *Vitaminy: účinné látky, podporující zdraví : [všechno, co musíte vědět o vitamínech, včetně údajů o jejich hodnotách v důležitých potravinách]*. Praha: Ikar, 1999. Kompas (Ikar). ISBN 80-720-2508-2.
- [19] VEBERIC, R., et al. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugar organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food chemistry*, 2009, vol. 114, issue 2, s. 511–515. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.080>.
- [20] BOROS, Borbála, Silvia JAKABOVÁ, Ágnes DÖRNYEI, Györgyi HORVÁTH, Zsuzsanna PLUHÁR, Ferenc KILÁR a Attila FELINGER. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of chromatography A* [online]. 2010, 7972–7980 [cit. 2018-11-12]. Dostupné z: www.elsevier.com/locate/chroma
- [21] VIAPIANA, Agnieszka a Marek WESOŁOWSKI. The Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Infusions of *Sambucus nigra* L. *Plant Food Hum Nutr*. 2017, (72), 82-87. DOI: 10.1007/s11130-016-0594-x. ISBN 10.1007/s11130-016-0594-x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-016-0594-x>
- [22] Slanina, J., Taborska, E.; Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka, *Chem. Listy*, 98, 239-245 (2004)
- [23] BALASUNDRAM, Nagendran, Kalyana SUNDRAM a Samir SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* [online]. 2006, c1984, 99(1), 191-203 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605006242>

- [24] KOPEC, Karel. Zelenina ve výživě člověka. Praha: Grada, 2010. Zdraví. ISBN 978-80-247-2845-2.
- [25] HELENOA, Sandrina A., Anabela MARTINSA, Maria JOÃO R.P. QUEIROZB a Isabel C.F.R. FERREIRA. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. Food chemistry [online]. 2015, (173), 501-513 [cit. 2019-02-18]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0308814614016197>
- [26] WANG, Lan, Yang YAO, Zhonghu HE, Desen WANG, Aihua LIU a Yong ZHANG, 2013. Determination of phenolic acid concentrations in wheat flours produced at different extraction rates. Journal of Cereal Science. 57(1), 67-72. DOI: 10.1016/j.jcs.2012.09.013. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521012002172>
- [27] KUMAR, Naresh a Vikas PRUTHI. Potential applications of ferulic acid from natural sources. DOI: 10.1016/j.btre.2014.09.002. ISBN 10.1016/j.btre.2014.09.002. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215017X14000368>
- [28] In: *PubChem Compound Database: National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445858#section=Top>
- [29] YILMAZ, Sevdan. *Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of Nile tilapia, Oreochromis niloticus to Aeromonas veronii* [online]. 2019, **86**, 384-392 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.11.068. ISSN 10504648. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464818307873>
- [30] HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, Georgina, Alfredo MARTINEZ a Guillermo GOSSET. Metabolic engineering strategies for caffeic acid production in Escherichia coli. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2019, **38**, 19-26 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1016/j.ejbt.2018.12.004. ISSN 07173458. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0717345818300538>
- [31] In: *PubChem Compound Database: National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/689043#section=Top>
- [32] LIU, Hung-Wen a Lew MANDER. *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier Science, 2010. ISBN 978-0-08-045382-8.
- [33] SINGH, Jaspreet a Lovedeep KAUR. *Advances in potato chemistry and technology*. Second editon. Boston: Elsevier/AP, [2016]. ISBN 978-0-12-800002-1.

- [34] FALLON, Brittany Burhop. The Next Big Skin Care Ingredient to Watch Out For Now. *NEWBEAUTY* [online]. 2016 [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: <https://www.newbeauty.com/blog/dailybeauty/9734-why-green-coffee-extract-is-the-next-big-skin-care-ingredient/>
- [35] In: *PubChem Compound Database: National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427#section=Top>
- [36] WATSON, Ronald R., Victor R. PREEDY a Sherma ZIBADI. *Polyphenols in human health and disease*. Boston: Elsevier/Academic Press, [2014]. ISBN 978-0-12-398456-2.
- [37] KHAN, Barkat Ali, Tariq MAHMOOD, Farid MENAA, Yasser SHAHZAD, Abid Mehmood YOUSAF, Talib HUSSAIN a Sidhartha D. RAY. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2019, **25** [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.2174/1381612825666190118150614. ISSN 13816128. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/169134/article>
- [38] RAJAN, Vijisha k. a K. MURALEEDHARAN. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2017, **220**, 93-99 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.178. ISSN 0308-8146.
- [39] In: *PubChem Compound Database: National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/370#section=Top>
- [40] *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population* [online]. Elsevier, 2009 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374228-5.X0001-7. ISBN 9780123742285.
- [41] Rutin. *Phytochemicals* [online]. [cit. 2019-02-21]. Dostupné z: <https://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rutin.php>
- [42] Rutin. *BIOOOO.cz* [online]. [cit. 2019-02-21]. Dostupné z: <https://encyklopedie.bioooo.cz/vyhledat-slozeni/rutin/>
- [43] In: *PubChem Compound Database: National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805#section=Top>
- [44] FEŘTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a praxi*. Praha: Maxdorf, 1994. ISBN 8 0-858-0020-9.
- [45] Struktura a funkce kůže. *Eucerin* [online]. [cit. 2019-02-22]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>

- [46] KOTINGOVÁ, Lenka, Lenka BORSKÁ a Zdeněk FIALA. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. *Chemické Listy* [online]. 2009, (103), 533-539 [cit. 2019-02-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_533-539.pdf
- [47] DZIAŁO, Magdalena, Justyna MIERZIAK, Urszula KORZUN, Marta PREISNER, Jan SZOPA a Anna KULMA. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, 17(2), 160- [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.3390/ijms17020160. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/2/160>
- [48] *A Brief History of High Performance Liquid Chromatography* [online]. [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <https://www.aapscollege.ca/blog/brief-history-high-performance-liquid-chromatography/>
- [49] Tswett's apparatus taken from his 1906 paper. In: *Chromatography - it's just a box* [online]. 2007 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: <http://www.itsjustabox.com/nuggets.htm>
- [50] DOHNAL, PH.D. ET PH.D, doc.RNDr.Vlastimil a Ing. Ivana KADLEČKOVÁ. *Analýza látek pomocí HPLC* [online]. Ústí nad Labem, 2013 [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: http://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Analiza_latek_pomoci_HPLC_Mevapox17102013.pdf. úloha je součástí předmětu Instrumentální analýza. Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem.
- [51] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [52] *Separační metody* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~koplikr/%C4%8C%C3%A1stA6_2.pdf
- [53] *HPLC* [online]. [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/images/obr21.gif>
- [54] *Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii*. Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova [online]. Praha: Josef Cvačka, 2010 [cit. 2018-04-07]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>
- [55] *Izolace kofeinu* [online]. In: . [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/.../LABT_04_Extrakce_kofeinu.doc

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

NAD	Nikotinamidadeninukleotid
NADP	Nikotinamidadeninukleotid-fosfát
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HIC	Hydrofilní interakční chromatografie
nm	Nanometr
HCOOH	Kyselina mravenčí
μm	Mikrometr
MF	Mobilní fáze
c	Koncentrace
°C	Stupeň celsia
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MeOH	Methanol
H ₂ O	Voda
DAD	Detektor s diodovým polem

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Květ bezu černého [3]	10
Obrázek 2 Plody černého bezu [3].....	11
Obrázek 3 Rozdělení polyfenolů [24].....	20
Obrázek 4 Struktura kůže [45].....	26
Obrázek 5 Struktura epidermisu [44].....	28
Obrázek 6 Struktura dermisu [44].....	29
Obrázek 7 Struktura kůže, hydrolipidický film [44].....	30
Obrázek 8 Historický přístroj pro kapalinovou chromatografii [49]	32
Obrázek 9 Schéma HPLC [53]	34
Obrázek 10 Dávkovací smyčka, kde P – čerpadlo, C – kolona, W – odpad a S –vzorek [51].	37
Obrázek 11 Chromatografická kolona [51]	38
Obrázek 12 Schéma detektoru s diodovým polem. [1] deuteriová výbojka, [2] štěrba, [3] čočka, [4] clona, [5] průtoková Z-cela detektoru, [6] konkávní holografická mřížka, [7] diodové pole.....	39
Obrázek 13 Vepřové ucho	44
Obrázek 14 Membrána z vepřového ucha	44
Obrázek 15 Sestavená aparatura Franzovy cely s membránou z vepřového ucha	45
Obrázek 16 Kalibrační řada kyseliny gallové – graf závislosti absorpce na koncentraci	49
Obrázek 17 Graf závislosti obsahu polyfenolů na navážce sušených květů.....	50
Obrázek 18 Rozdíly v barvě u různých navážek ze sušených květů černého bezu	50
Obrázek 19 Graf závislosti obsahu polyfenolů na teplotě extrakční vody	51
Obrázek 20 Rozdíly v barvě podle různé teploty extrakčního rozpouštědla	52
Obrázek 21 Grafická závislost obsahu polyfenolů na typu extraktu	53
Obrázek 22 Rozdíly v barvě v extraktů s různým podílem stonků.....	54
Obrázek 23 Směsný standardní roztok kyselin separovaný finální mobilní fází.....	55
Obrázek 24 Spektra studovaných kyselin	55
Obrázek 25 Grafické znázornění kyseliny chlorogenové ve vzorcích.....	57
Obrázek 26 Grafické znázornění obsahu kyseliny kávové ve vzorcích	58

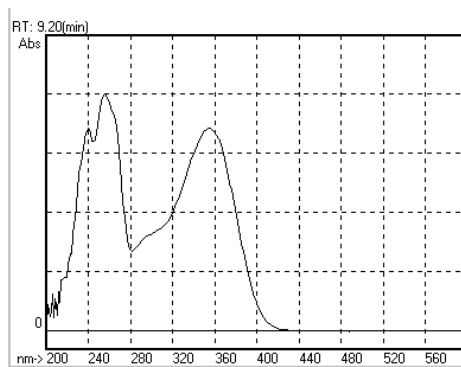
Obrázek 27 Grafické znázornění obsahu kyseliny ferulové ve vzorcích.....	58
Obrázek 28 Grafické znázornění fenolických kyselin ve fyziologickém roztoku po 30 minutách v extraktu z květů.....	63
Obrázek 29 Grafické znázornění fenolických kyselin ve fyziologickém roztoku po 30 minutách v zakoncentrovaném extraktu z květů.....	65
Obrázek 30 Grafické znázornění propustnosti fenolických kyselin u extraktu z květů a zahuštěného extraktu z květů po 30 minutách	65

9 SEZNAM TABULEK

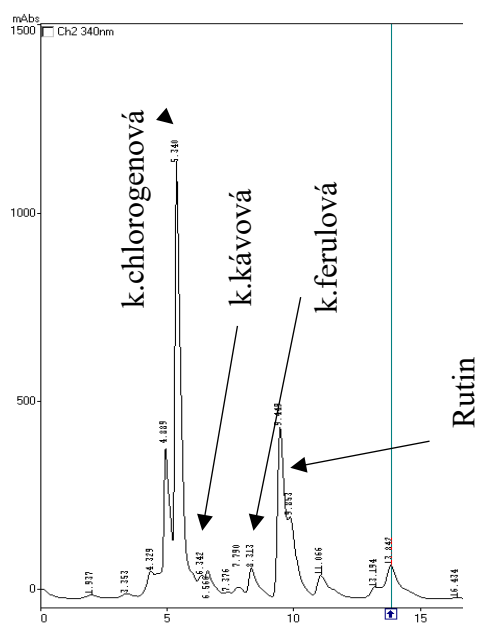
Tabulka 1 Taxonomická tabulka bezu černého [5]	12
Tabulka 2 Množství minerálních látek v černém bezu podle odrůdy [18]	17
Tabulka 3 Naměřená absorbance kalibrační řady v závislosti na koncentraci	48
Tabulka 4 Vypočtené hodnoty obsahu polyfenolů v extraktech o různé navážce květů	49
Tabulka 5 Vypočtené hodnoty obsahu polyfenolů v extraktech při různých teplotách.....	51
Tabulka 6 Vypočtené hodnoty obsahu polyfenolů v extraktech o různém poměru stonků a květů	53
Tabulka 7 Výpočet na nejbližší kalibrační standard u kyseliny chlorogenové.....	56
Tabulka 8 Výpočet na nejbližší kalibrační standard u kyseliny kávové	56
Tabulka 9 Výpočet na nejbližší kalibrační standard u kyseliny ferulové	56
Tabulka 10 Vypočítané obsahy fenolických kyselin v různých typech extraktu.....	57
Tabulka 11 Vypočtené hodnoty prostupnosti fenolických látek přes kožní membránu u směsného roztoku kyselin	60
Tabulka 12 Vypočtené hodnoty prostupnosti fenolických kyselin přes syntetickou membránu o velikosti pórů 0,40 μm	61
Tabulka 13 Vypočtené hodnoty prostupnosti fenolických kyselin přes syntetickou membránu o velikosti 0,23 μm	61
Tabulka 14 Propustnost kyseliny chlorogenové přes kožní membránu.....	62
Tabulka 15 Propustnost kyseliny kávové přes kožní membránu.....	62
Tabulka 16 Propustnost kyseliny ferulové přes kožní membránu	62
Tabulka 17 Vypočítané hodnoty prostupu kyseliny chlorogenové přes kožní membránu.....	64
Tabulka 18 Vypočítané hodnoty prostupu kyseliny kávové přes kožní membránu	64
Tabulka 19 Vypočítané hodnoty prostupu kyseliny ferulové přes kožní membránu	64

10 SEZNAM PŘÍLOH

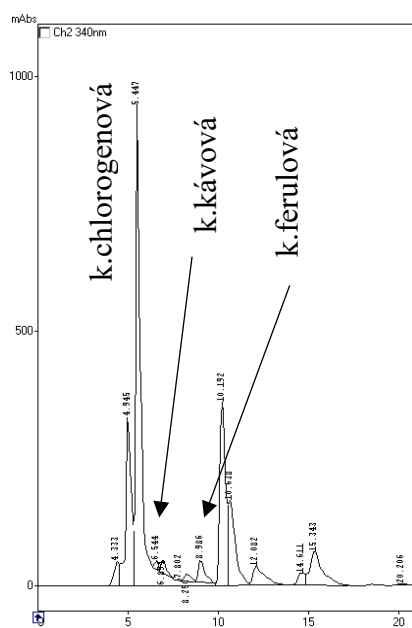
Příloha č. 1 Spektrum rutinu	78
Příloha č. 2 Extrakt z květů černého bezu černého bezu	78
Příloha č. 3 Extrakt květů černého bezu spolu se stonky	78
Příloha č. 4 Extrakt z květů černého bezu zakoncentrovaný	79
Příloha č. 5 Extrakt ze stonků černého bezu	79
Příloha č. 6 Extrakt ze stonků obohacený o standard kyseliny kávové	80
Příloha č. 7 Extrakt ze stonků obohacený o standard kyseliny ferulové	80
Příloha č. 8 Směsný roztok kyselin prostupující přes membránu s póry o velikosti 0,23 μm ..	81
Příloha č. 9 Směsný roztok kyselin prostupující přes membránu s póry o velikosti 0,40 μm ..	81
Příloha č. 10 Extrakt z květů prostoupený kožní membránou do fyziologického roztoku po půl hodině	82
Příloha č. 11 Extrakt z květů prostoupený kožní membránou do fyziologického roztoku po dvou hodinách	82
Příloha č. 12 Extrakt z květů zakoncentrovaný prostoupený kožní membránou do fyziologického roztoku po půl hodině	83



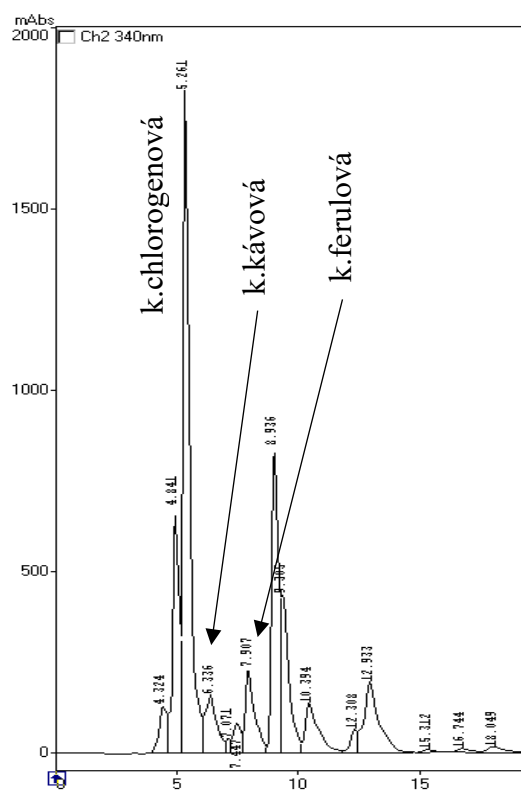
Příloha č. 1 Spektrum rutinu



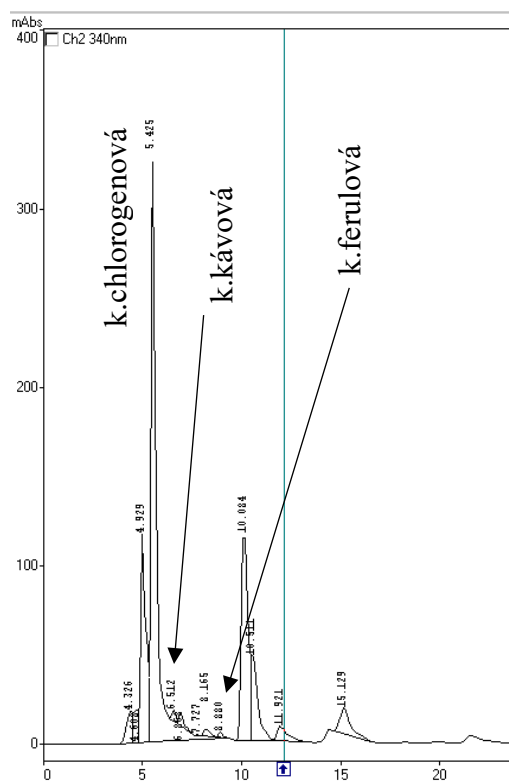
Příloha č. Chromatogram extraktu z květů černého bezu



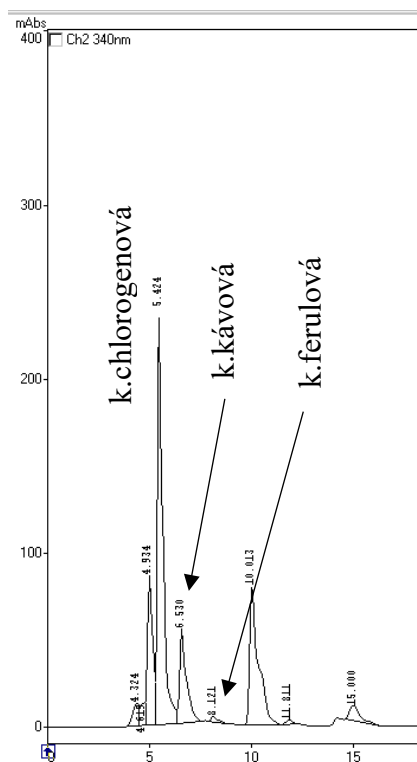
Příloha č. 2 Chromatogram extraktu ze směsi květů a stonků černého bezu



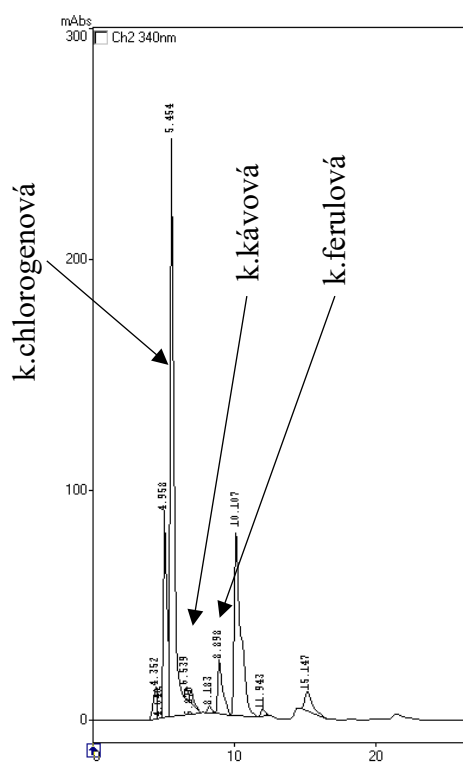
Příloha č. 3 Chromatogram extraktu z květů černého bezu zakoncentrovaného vakuovou odparkou



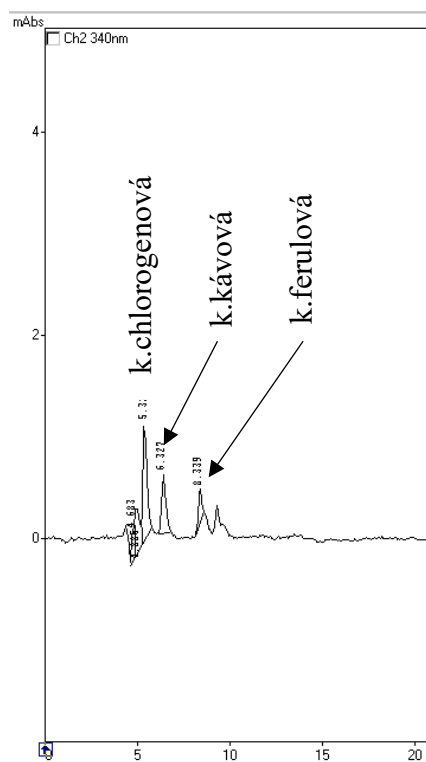
Příloha č. 4 Chromatogram extraktu z květních stonků černého bezu



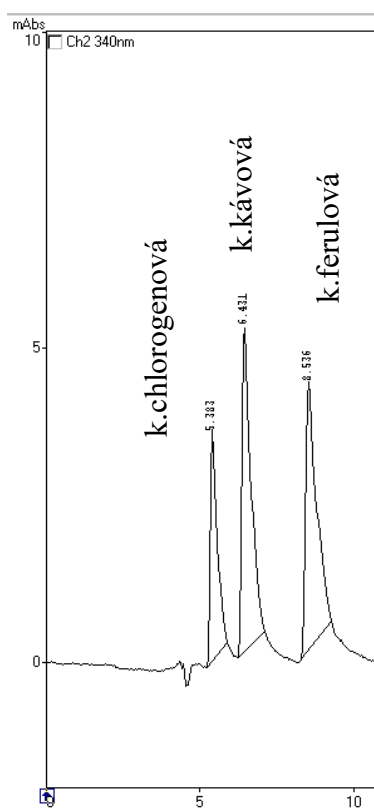
Příloha č. 5 Chromatogram extraktu z květních stonků obohacený o standard kyseliny kávové



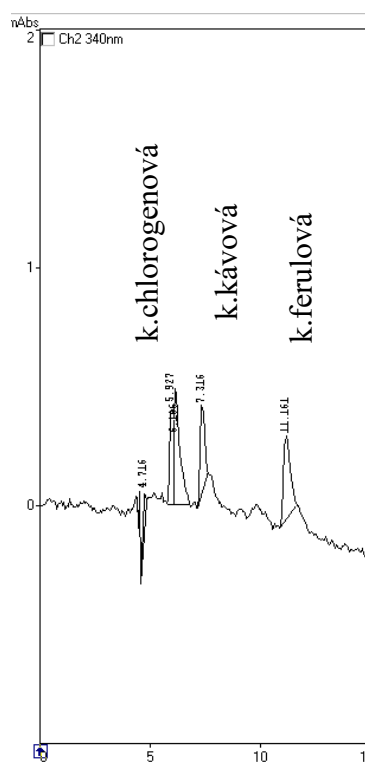
Příloha č. 6 Chromatogram extraktu z květních stonků obohaceného o standard kyseliny ferulové



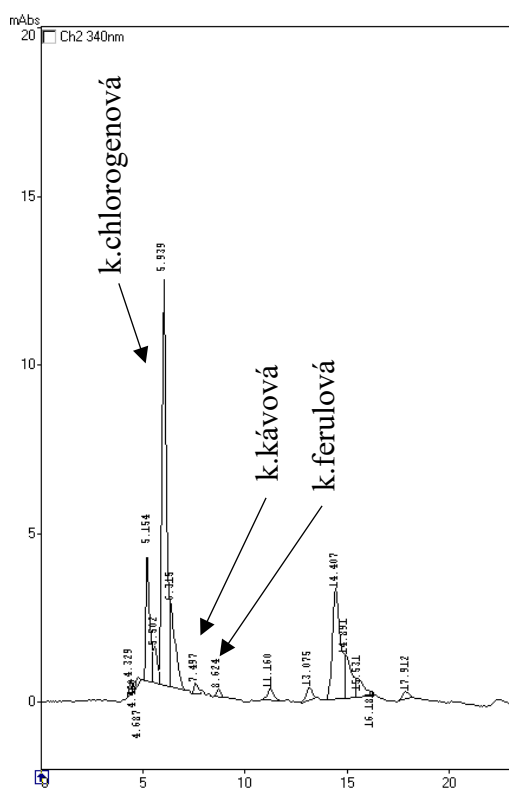
Příloha č. 7 Chromatogram směsného standardu kyselin prostupujícího přes membránu s póry o velikosti 0,23 µm



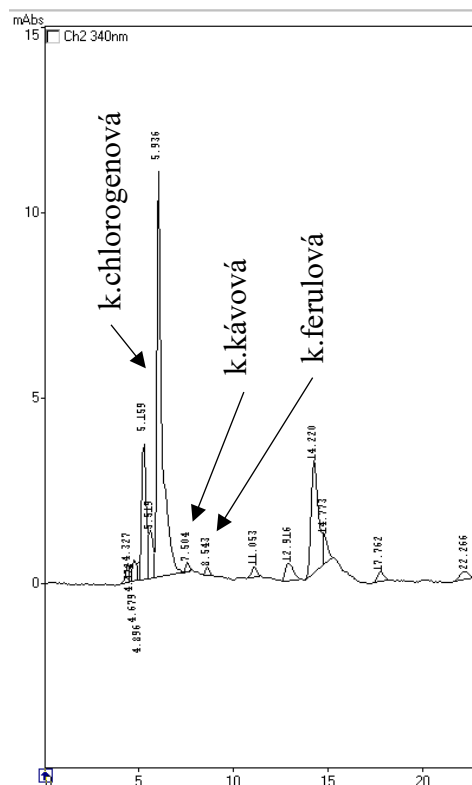
Příloha č. 8 Chromatogram směsného standardu kyselin prostupujícího přes membránu s póry o velikosti 0,40 µm



Příloha č. 9 Chromatogram extraktu z bezových květů prostoupeného kožní membránou do fyziologického roztoku Franzovy cely a odebraný po půl hodině



Příloha č. 10 Chromatogram extraktu z bezových květů prostoupeného přes kožní membránu a odebraný po 2 hodinách z dolní části Franzovy cely



Príloha č. 11 Chromatogram zakoncentrovaného extraktu z bezových kvetů odebraného po půl hodině z dolní části Franzovy cely